

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”



FACOLTÀ DI INGEGNERIA

**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DEI MATERIALI
E DELLA PRODUZIONE**

DOTTORATO DI RICERCA IN INGEGNERIA

DEI MATERIALI E DELLE STRUTTURE

XX° CICLO

**INGEGNERIZZAZIONE MATERIALI
COLLAGINEI PER IL RIPARO
DI TESSUTI CARDIACI**

Tutor:

PROF. P.A. NETTI

Coordinatore:

PROF. D. ACIERNO

Candidato:

VALENTINA COCCOLI

Indice

<i>Introduzione.....</i>	<i>1</i>
 <i>Capitolo 1 - Biomateriali per il trattamento dell'infarto miocardico.....</i>	<i>6</i>
<i>1.1. – Biomateriali per il contenimento del ventricolo sinistro (LV).....</i>	<i>9</i>
<i>1.2. – Tessuto miocardico ingegnerizzato in vitro.....</i>	<i>11</i>
<i>1.3. – Tessuto miocardio ingegnerizzato in situ.....</i>	<i>13</i>
<i>1.4. – Limiti dei metodi tradizionali di rigenerazione del miocardio.....</i>	<i>17</i>
<i>1.5. – Nuovi approcci dell'ingegneria dei tessuti per la rigenerazione del miocardio.....</i>	<i>20</i>
<i>1.5.1. – Cell sheet engineering.....</i>	<i>20</i>
<i>1.5.2. – Microsfere per il rilascio di tessuti e cellule.....</i>	<i>26</i>
<i>1.6. – Rilascio di fattori di crescita per stimolare la rigenerazione del miocardio.....</i>	<i>30</i>
 <i>Capitolo 2 - Analisi sperimentale: Strumenti e Metodi.....</i>	<i>37</i>
<i>2.1. – Materiali utilizzati.....</i>	<i>37</i>
<i>2.2. – Preparazione delle microsfere.....</i>	<i>47</i>
<i>2.2.1. – Singola emulsione.....</i>	<i>47</i>
<i>2.2.2. – Doppia emulsione.....</i>	<i>49</i>
<i>2.3. – Incapsulamento di IGF-1 nelle microsfere lisce.....</i>	<i>50</i>

2.4. – Semina delle cellule mesenchimali umani del midollo osseo nelle spinner flask.....	51
2.5. - Animali ed induzione della patologia.....	51
2.6. - Inoculazione sfere nel miocardio.....	52
2.7. - Analisi dei campioni.....	53
2.7.1. – Analisi morfologica: SEM.....	53
2.7.2. - Analisi dimensionale microsfe: Image J.....	56
2.7.3. - Analisi termica:DSC.....	56
2.7.4. – Analisi efficienza di crosslink: FTIR.....	59
2.7.5. – Analisi swelling microsfe: ImageJ.....	61
2.7.6. - Analisi del rilascio di IGF-1 dalle microsfe lisce.....	62
2.7.7. - Test di citotossicità dell'agente crosslinkante-Coltura fibroblasti su microsfe lisce.....	67
2.7.8. - Coltura cellule mesenchimali staminali (MSC) su microsfe porose in gelatina.....	67
2.7.8.1. - Densità cellulare e vitalità.....	68
2.7.8.2. - Colorazione con MTT.....	68
2.7.8.3. – Istologia.....	69
2.7.8.4. - Analisi ESEM campioni biologici... ..	69
2.7.8.5. - Analisi LSCM campioni biologici.....	70
2.7.9. - Impianto in vivo.....	74
2.7.9.1. - Studi istologici campioni in vivo.....	74
2.7.9.2.- Valutazione immunoistochimica.....	74

2.7.9.3. - Valutazione dell'apoptosi.....	75
2.7.9.4. - Analisi quantitativa.....	75
 <i>Capitolo 3 – Risultati e Discussioni.....</i>	 76
3.1. – Singola emulsione.....	76
3.1.1. – Analisi morfologica.....	76
3.1.2. – Analisi dimensionale.....	83
3.1.3. – Analisi Termica.....	85
3.1.4. – Analisi dell'efficienza crosslink	88
3.1.5. - Analisi delle proprietà di swelling.....	90
3.1.6. - Coltura fibroblasti - Test di citotossicità	92
3.1.7. – Analisi del rilascio di IGF-1.....	96
3.2. – Doppia emulsione.....	97
3.2.1. – Analisi morfologica.....	97
3.2.2. – Coltura cellulare con MSCs.....	99
3.3. – Impianto in vivo.....	105
 <i>Capitolo 4 – Conclusioni e sviluppi futuri.....</i>	 114
 <i>Bibliografia.....</i>	 117

Introduzione

Il presente lavoro di Dottorato di Ricerca ha come scopo la realizzazione e lo sviluppo di una nuova strategia per riparare e/o rigenerare il tessuto miocardico in seguito ad infarto cardiaco acuto.

Tale progetto rientra nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti, una scienza che mira a riparare e/o sostituire organi e tessuti danneggiati mediante il rilascio di cellule funzionali, scaffold di supporto, promotori di crescita e molecole bioattive. L'ingegneria dei tessuti è stata definita dai suoi fondatori, il Prof. Langer ed i Dott. Vacanti, come una scienza interdisciplinare che applica le metodologie ed i principi propri dell'ingegneria e delle scienze della vita per realizzare sostituti biologici in grado di ricreare, mantenere o migliorare le funzioni di organi o tessuti danneggiati [1].

Le strategie dell'ingegneria dei tessuti promettono di rivoluzionare le terapie attuali per il trattamento di un danno irreversibile al miocardio o di arresto cardiaco e migliorare la qualità della vita di milioni di pazienti nel mondo.

La sfida più grande nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti cardiovascolari è la realizzazione di un muscolo cardiaco completamente ingegnerizzato *in vitro*. I recenti sviluppi circa l'isolamento delle cellule staminali, la loro coltura nei bioreattori e la sintesi di materiali bioattivi mostrano grandi promesse nel contribuire al raggiungimento di tale scopo. Inoltre, le nuove scoperte nel campo della biologia delle cellule staminali suggeriscono che quest'ultime sono una sorgente potenziale di cellule per il muscolo cardiaco e per i vasi sanguigni, e potrebbero essere usate dai medici cardiologi per ricostruire o sostituire il tessuto cardiaco danneggiato.

Ad oggi, purtroppo, non è stato ancora risolto il problema fondamentale di come trattare milioni di pazienti all'anno al mondo che sopravvivono ad un infarto acuto del miocardio ma che sviluppano un arresto cardiaco nonostante le terapie mediche [2]. L'incapacità di prevenire la morbidità associata ad attacchi cardiaci pone un peso enorme sui pazienti, i loro familiari e tutta la comunità. Sicuramente il trapianto è la soluzione migliore per i pazienti che presentano un danno incurabile al cuore; tuttavia, la disponibilità di organi è molto scarsa e vi è un enorme *gap* tra la domanda e l'offerta di terapie di sostituzione del cuore. Anche la recente creazione di dispositivi di

contenimento del ventricolo sinistro non è stata in grado di colmare questo *gap* in quanto essi possono fornire un'opzione terapeutica solo temporanea per i pazienti con danni alle pompe; si tratta, quindi, di un trattamento pre-trapianto ma non di una terapia definitiva [3]. Pertanto, vi è un grande interesse nell'introduzione di nuove strategie terapeutiche alternative per trattare questa malattia mortale così diffusa.

La scienza dell'ingegneria del tessuto cardiaco si presenta come un nuovo concetto terapeutico [4] che, attraverso terapie cellulari, ha lo scopo di “far crescere” il muscolo cardiaco ed il tessuto cardiovascolare *in vitro*.

Le terapie cellulari prese in considerazione sono:

- 1) Trapianto diretto di cellule nell'ambiente lesionato;
- 2) Tecniche di ingegneria dei tessuti per sviluppare tessuti sostitutivi;
- 3) Terapie che stimolano il cuore a rigenerare i tessuti danneggiati attraverso somministrazione diretta di fattori di crescita.

L'abilità di ingegnerizzare o rigenerare il tessuto miocardico danneggiato mediante tali terapie mostra grandi promesse. Tuttavia, la scienza dell'ingegneria dei tessuti cardiaci deve ancora superare diverse difficoltà e sfide. Una delle maggiori sfide riguarda la progettazione di scaffold bioattivi che possano fungere da supporto alla rigenerazione della struttura miocardica. In tale ambito è molto importante che tali scaffold siano in grado di promuovere la vascolarizzazione e l'innervazione all'interno del tessuto miocardico ingegnerizzato.

Lo scopo di questo lavoro di Dottorato di Ricerca è di sviluppare una terapia innovativa per la rigenerazione del tessuto cardiaco in seguito ad infarto acuto che si presenta come una strategia ibrida tra quelle tradizionali dell'ingegnerizzazione del miocardio. In particolare, si tratta di una strategia che si pone come obiettivo quello di rilasciare contemporaneamente nel tessuto infartuato cellule staminali e fattori di crescita mediante l'utilizzo di microsfele in materiale collagineo. In questo modo, è possibile fornire alle cellule un substrato per la loro adesione e allo stesso tempo rilasciare fattori di crescita in grado di promuovere la crescita e la differenziazione delle cellule staminali. Inoltre, grazie alla dimensione molto ridotta delle microsfele è possibile assicurare la diffusione di nutrienti ed ossigeno alle cellule senza alcun ostacolo al trasporto di massa. Infine, tale tecnologia presenta il grande vantaggio di essere

perfettamente iniettabile nel miocardio mediante iniezione intramiocardica, una tecnica molto meno invasiva rispetto alle tradizionali operazioni chirurgiche a cuore aperto.

La caratteristica basilare che un biomateriale deve possedere affinché possa essere utilizzato per applicazioni biomediche è la biocompatibilità, ossia la capacità di un materiale di indurre una risposta biologica in grado di favorire il recupero funzionale del tessuto nella sede dell'impianto senza interferire con i meccanismi di riparo tessutale e senza generare reazioni infiammatorie o immunitarie avverse. La scelta di utilizzare materiali collaginei per il presente lavoro di tesi è legata al fatto che tali materiali presentano caratteristiche superiori rispetto a quelle dei polimeri sintetici principalmente per il loro modo di interagire con il corpo umano [5]. Il collagene gioca un ruolo importante nella formazione di organi e tessuti ed è coinvolto in numerose espressioni funzionali delle cellule. Inoltre, il collagene è un materiale biodegradabile, debolmente antigenico e mostra doti di biocompatibilità superiori a quelle di altri polimeri naturali [6]. La maggiore attrattiva del collagene come biomateriale riguarda il fatto che si tratta di un materiale naturale a bassa immunogenicità e, per questo, viene riconosciuto dal corpo umano come un costituente naturale piuttosto che una sostanza esterna [7]. I materiali collaginei possono essere processati in svariate forme, quali ad esempio film, spugne, sfere/compresse, nanosfere/nanoparticelle. Questi sistemi sono stati applicati sia come sistemi di *drug delivery* che come guide per l'ingegneria dei tessuti.

In particolare, il materiale collageneo preso in considerazione in questo lavoro di tesi è la gelatina, una proteina naturale ottenuta mediante denaturazione termica o degradazione chimica o fisica del collagene. Questo processo determina la rottura della struttura a tripla elica del collagene con conseguente ottenimento di una sostanza con conformazione casuale, *random coil*, tipica della gelatina. Una delle principali caratteristiche di tale proteina è la sua biocompatibilità e la formazione di prodotti di degradazione non tossici e rapidamente metabolizzati.

Il primo stadio di questo lavoro consiste nella realizzazione di microsfele lisce e porose in gelatina attraverso l'utilizzo delle metodologie di singola emulsione (W/O) e doppia emulsione (O/W/O), rispettivamente. In particolare, uno degli obiettivi di tale studio è quello di ottimizzare il processo di preparazione delle microsfele in modo tale che le microsfele lisce possano essere utilizzate come sistema di rilascio controllato di fattori

di crescita e le microsfere porose abbiano caratteristiche idonee per l'adesione delle cellule sulla loro superficie e all'interno dei pori.

La scelta delle microsfere in gelatina come sistema di rilascio controllato del fattore di crescita IGF-1 è legata alla sua proprietà di essere un idrogelo carico elettrostaticamente. Nello specifico, il fattore di crescita IGF-1, che presenta una carica leggermente positiva, può essere incapsulato all'interno della gelatina acida (punto isoelettrico 5) mediante complessazione polianionica in seguito all'assorbimento da parte della gelatina di una soluzione acquosa contenente una certa percentuale del fattore di crescita. In questo modo non si corre il rischio di denaturare o degradare la proteina in seguito a processi di incapsulamento tradizionali piuttosto invasivi.

La scelta delle microsfere porose in gelatina come substrato per la coltura cellulare è dovuto, invece, essenzialmente alla loro peculiarità di possedere un elevato rapporto area superficiale/volume. Questa si traduce nella presenza di un'elevata superficie per l'adesione e crescita cellulare di un'ampia varietà di cellule. Inoltre, le microsfere in gelatina sono delle matrici biologicamente inerti che forniscono un substrato forte ma non rigido per la coltura cellulare in agitazione. Infine, la presenza di una porosità interna può fornire una protezione per le cellule dalle collisioni tra le biglie e dalle turbolenze dovute all'agitazione in coltura.

In particolare, il metodo utilizzato per la realizzazione delle microsfere lisce consiste nell'emulsione water-in-oil (W/O) in cui la soluzione acquosa contenente la gelatina (water) viene dispersa in una fase oleosa continua (oil).

Il metodo di preparazione delle microsfere porose, invece, consiste in una singola emulsione effettuata come se fosse una doppia emulsione (O/W/O). Inizialmente, la fase oil viene dispersa sotto forma di goccioline mediante agitazione magnetica nella fase acquosa contenente gelatina. All'aumentare della quantità di oil aggiunto la fase acquosa diventerà la fase dispersa e quella oil la fase disperdente. In questo modo si formano microsfere di gelatina contenenti al loro interno goccioline di oil.

Per entrambe le tecniche di preparazione si vuole investigare l'effetto delle condizioni di processo sulla dimensione delle particelle, sulla distribuzione dimensionale e sulla morfologia.

La seconda fase del lavoro di tesi si è concentrato sulla coltura delle cellule staminali mesenchimali adulte del midollo osseo (hMSC) sulle microsfere porose e sul rilascio *in*

vitro del fattore di crescita IGF-1 dalle microsfere lisce, al fine di promuovere la proliferazione e crescita della cellule staminali in cardiomiociti per il riparo del miocardio in seguito ad infarto acuto.

Le prove biologiche mirano ad ottimizzare il processo di semina delle hMSC sulle microsfere porose mediante un processo di coltura in agitazione dinamica all'interno di sistemi appositi, le spinner flask. Sono state effettuate analisi di adesione cellulare, vitalità delle cellule mediante test MTT ed analisi morfologiche e istologiche.

Infine, si vuole procedere all'impianto *in vivo* delle microsfere porose seminate con le hMSC e delle microsfere lisce contenenti IGF-1 in ratti secondo un modello animale di infarto miocardico acuto.

I gruppi di studio sono i seguenti:

1. Ratti sottoposti ad infarto del miocardio e trattati con microsfere in gelatina vuote;
2. Ratti sottoposti ad infarto del miocardio e trattati con microsfere in gelatina contenenti IGF-1;
3. Ratti sottoposti ad infarto del miocardio e trattati con cellule staminali mesenchimali;
4. Ratti sottoposti ad infarto del miocardio e trattati con microsfere in gelatina seminate con cellule staminali mesenchimali;
5. Ratti sottoposti ad infarto del miocardio e trattati con microsfere in gelatina contenenti IGF-1 e microsfere in gelatina seminate con cellule staminali mesenchimali.

Nella fase preliminare di test *in vivo*, riportati in questo lavoro, sono eseguiti gli esperimenti sui primi due gruppi di studio.

L'obiettivo è, quindi, di rigenerare e/o riparare il tessuto miocardico in seguito ad un infarto dello stesso. La strategia adottata consiste nel somministrare contemporaneamente microsfere in gelatina contenenti il fattore di crescita IGF-1 e microsfere in gelatina seminate con cellule mesenchimali staminali, al fine di promuovere la differenziazione di tali cellule in cardiomiociti per attivare la rigenerazione del tessuto cardiaco lesionato.

Capitolo 1

Biomateriali per il trattamento dell'infarto miocardico

L'infarto miocardico è una delle cause maggiori di morte al mondo. Sono circa 12 milioni i morti all'anno nel mondo, il che vuol dire che circa ogni 2 sec una persona muore per un infarto cardiaco acuto. La maggior parte dei pazienti muore ancora prima di arrivare in ospedale. Il tasso di sopravvivenza dei pazienti in ospedale è di circa 90-95%. Questa percentuale rappresenta un significativo aumento della sopravvivenza all'infarto ed è legato ai continui sviluppi e miglioramenti delle strategie di trattamento. L'infarto acuto del miocardio è definito come la morte o necrosi delle cellule miocardiche. Esso si presenta quando l'ischemia nel miocardio supera una soglia limite e distrugge i meccanismi di riparo cellulare che sono designati a mantenere le normali funzioni cardiache attive e l'emostasi. L'ischemia per un periodo di tempo prolungato determina un irreversibile danno o morte delle cellule del miocardio. Un'ischemia critica del miocardio può avvenire come risultato dell'aumento del metabolismo e/o della diminuzione di rilascio di ossigeno e nutrienti al miocardio attraverso la circolazione coronarica. Un'interruzione dell'apporto di ossigeno e nutrienti al miocardio avviene quando un trombo è sovrapposto ad una placca aterosclerotica ulcerata o instabile e risulta in una occlusione delle coronarie. Una stenosi delle arterie coronarie elevata ($>75\%$), dovuta ad aterosclerosi o ad una stenosi dinamica associata ad un vasospasmo delle coronarie, può, quindi, limitare l'apporto di ossigeno e nutrienti e determinare un infarto del miocardio. Le condizioni associate ad un aumento del metabolismo del miocardio includono sforzi fisici estremi, ipertensioni elevate (incluso alcune forme di cardiomiopatia ostruttiva ipertrofica) e gravi stenosi delle valvole aortiche. Altre patologie delle valvole cardiache e stati di bassa funzione cardiaca associati a diminuzione della pressione diastolica dell'aorta, che è la principale componente della pressione di perfusione coronarica, possono determinare un infarto miocardico (Fig. 1).

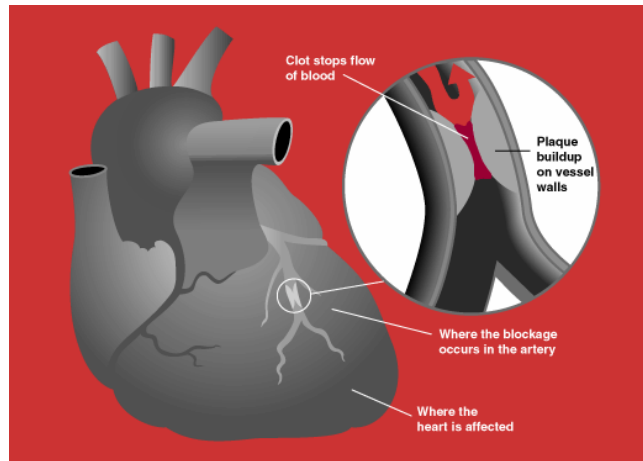


Fig. 1: Rappresentazione schematica di infarto miocardico

L'infarto del miocardio genera una disfunzione ventricolare sinistra dovuta principalmente alla perdita di tessuto funzionale. Nelle fasi iniziali dell'insufficienza cardiaca, l'organismo cerca di sostenere la performance cardiaca attivando meccanismi di adattamento emodinamico e neuromonale che, associati all'attivazione di processi necrotici ed apoptotici innescano a loro volta un processo di rimodellamento patologico che sfocia inesorabilmente in un franco scompenso cardiaco. La prevenzione o l'attenuazione dei processi che attivano il rimodellamento patologico ventricolare sinistro rappresenta un fondamentale obiettivo terapeutico [8].

L'arresto cardiaco dopo l'infarto del miocardio (MI) è in genere una malattia progressiva. Dopo la morte dei cardiomiociti, i macrofagi, i monociti ed i neutrofili migrano nell'area dell'infarto promuovendo la risposta infiammatoria. A causa dell'attivazione della matrice delle metalloproteasi, che degradano la matrice extracellulare, l'area dell'infarto si espande. L'indebolimento della matrice extracellulare provoca un assottigliamento della parete del miocardio ed una dilatazione ventricolare [9].

Negli ultimi anni, nuove metodologie per il trattamento del miocardio danneggiato, stanno emergendo come possibile alternativa al trapianto di cuore.

Il trapianto di organi è sempre stato limitato da due maggiori ostacoli, la mancanza critica di donatori e l'alto rischio di rigetto dell'impianto. Per superare questi limiti, il Professore Robert Langer, ingegnere chimico, e i Dottori Joseph e Charles Vacanti, medici, hanno proposto il concetto dell'ingegneria dei tessuti [10-12]. Tale scienza consiste nell'applicazione dei principi e delle metodologie proprie dell'ingegneria e

delle scienze della vita per realizzare sostituti biologici in grado di riparare, mantenere e/o rigenerare organi e tessuti danneggiati. L'idea del Prof. Langer e dei Dott. Vacanti era che la realizzazione di organi e tessuti ingegnerizzati in laboratorio sarebbe stata in grado di rispondere alla domanda a cui il trapianto di organi non era stato in grado di far fronte. I metodi tradizionali dell'ingegneria dei tessuti si sono in genere focalizzati su una delle seguenti due strategie: l'iniezione di una sospensione di cellule isolate e l'utilizzo di scaffold biodegradabili come supporto alla formazione di tessuto.

Per quanto concerne la rigenerazione del miocardio infartuato, gli studi si sono soffermati inizialmente sull'iniezione delle cellule direttamente nel miocardio in seguito all'infarto, tecnica denominata cardiomioplastica.

Gli approcci proposti dall'ingegneria dei tessuti per il riparo del miocardio mediante l'utilizzo di scaffold biodegradabili sono, invece, essenzialmente tre: l'utilizzo di reti (meshes) realizzate con diversi materiali polimerici per prevenire l'espansione del ventricolo sinistro, l'ingegnerizzazione *in vitro* del tessuto, ossia una prima fase di coltura cellulare sullo scaffold *in vitro* e in seguito l'impianto *in vivo*; e, infine, l'utilizzo di tessuti ingegnerizzati *in situ*, i quali vengono iniettati direttamente nel miocardio (Fig. 2).

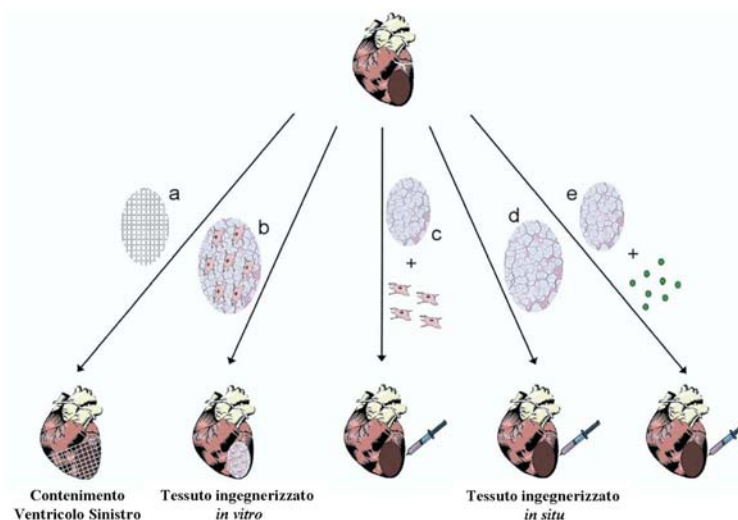


Fig.2 Strategie per il trattamento dell'infarto miocardico mediante l'utilizzo di biomateriali. Ad oggi, esistono tre metodi: si possono cucire delle reti polimeriche intorno al cuore come contenimento del ventricolo sinistro per conservare la sua geometria; l'ingegnerizzazione del tessuto *in vitro* consiste nella coltura delle cellule su biomateriale in vitro ed il seguente impianto *in vivo*; infine, l'ingegnerizzazione del tessuto *in situ* consiste nell'iniettare il biomateriale da solo oppure utilizzando uno scaffold iniettabile come veicolo per il rilascio di cellule o di agenti terapeutici, quali geni o proteine.

In Tab.1 sono riportati tutti i biomateriali attualmente utilizzati per il trattamento del miocardio infartuato.

Material	Transplantation
Left ventricular restraint	
Polypropylene	Alone
Polyester	Alone
In vitro engineered tissue	
Gelatin	Alone or with fetal cardiomyocytes
Alginate	With fetal cardiomyocytes
Poly(glycolide)/poly(lactide)	With dermal fibroblasts
Collagen type I and matrigel	With neonatal cardiomyocytes
PTFE, PLA mesh, collagen type I, and matrigel	Alone or with bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells
Collagen type I	Alone or with embryonic stem cells
PNIPAAm (cell culture dish)	Cell sheet of neonatal cardiomyocytes or adipose-derived mesenchymal stem cells
In situ engineered tissue	
Fibrin	Alone, with skeletal myoblasts, bone marrow mononuclear cells, or pleiotrophin plasmid
Collagen	Alone or with bone marrow cells
Alginate	Alone
Matrigel	Alone or with embryonic stem cells
Collagen type I and matrigel	Alone or with neonatal cardiomyocytes
Self-assembling peptides	Alone, with neonatal cardiomyocytes, or with platelet-derived growth factor BB
Gelatin	With basic fibroblast growth factor

PLA = poly(L-lactic) acid; PNIPAAm = poly(N-isopropylacrylamide); PTFE = poly(tetrafluoroethylene).

Tab.1: Biomateriali per il trattamento del miocardio infartuato [9].

1.1 Biomateriali per il contenimento del ventricolo sinistro (LV)

Per prevenire il rimodellamento negativo del ventricolo sinistro e la sua dilatazione, associata all’infarto miocardico acuto [13], molti studi hanno esaminato l’utilizzo di biomateriali come supporto per il contenimento del ventricolo sinistro.

Kelly *et al.* [14] per primi hanno dimostrato che, limitando l’espansione dell’infarto, si può prevenire l’indebolimento della funzione cardiaca dopo un infarto miocardico acuto. Il gruppo di Kelly ha suturato una *mesh* in polipropilene (Marlex) nel miocardio nel sito dove è stato successivamente indotto l’infarto. Il contenimento della parete dell’infarto è stato in grado di preservare sia la geometria del ventricolo sinistro che la funzione cardiaca.

Bowen *et al.* [15] hanno inoltre dimostrato che una *mesh* in polipropilene determina un aumento del collagene e riduce l’attività degli MMP-1 e -2 nella zona di confine del miocardio; tuttavia, entrambe le componenti della matrice sono risultate invariate all’interno dell’infarto.

Moainie *et al.* [16] non hanno riportato alcuna differenza significativa tra gli animali in cui è stato impiantato Marlex e quelli di controllo. La *mesh* Marlex è stata anche confrontata con la *mesh* Merselene avvolta intorno al ventricolo sinistro.

Enomoto *et al.* [17] hanno riportato che, l'avvolgimento di Merselene intorno al ventricolo sinistro, migliora il rimodellamento se confrontata con una mesh che riveste solo l'aerea infartuata, indicando che il rinforzamento solo della zona dell'infarto non è un trattamento sufficiente.

Un altro tipo di contenimento del ventricolo sinistro consiste in una mesh in poliestere sviluppata da Acorn Cardiovascular Inc. (St.Paul, Minnesota). In uno studio svolto da Chaudhry *et al.* [18], è stato dimostrato che il dispositivo di supporto cardiaco (CSD), adattato intorno ad entrambi i ventricoli, diminuisce il volume del ventricolo sinistro, l'ipertrofia dei miociti, la fibrosi interstiziale ed aumenta la diminuzione frazionale.

Saavedra *et al.* [19] hanno inoltre dimostrato che un dispositivo di supporto cardiaco potrebbe anche indurre un rimodellamento inverso, ossia far decrescere il volume del ventricolo sinistro.

Pilla *et al.* [20] hanno mostrato, in un modello animale ovino, una diminuzione della dilatazione del ventricolo sinistro ed un aumento della frazione di eiezione in seguito ad infarto miocardico. Sabbah *et al.* [21], invece, in un modello animale canino di attacco cardiaco cronico, hanno ottenuto effetti simili al gruppo di Pilla e una riduzione dell'ipertrofia dei miociti.

Konertz *et al.* [22] hanno riportato un miglioramento della frazione di eiezione ed una riduzione del volume del ventricolo sinistro in 27 pazienti con attacco cardiaco, a tre e sei mesi dopo l'impianto di un dispositivo di supporto cardiaco.

Franco-Cereceda *et al.* [23] hanno inoltre riportato un aumento della funzione del ventricolo sinistro ed una diminuzione del volume di quest'ultimo in un *trial* con otto pazienti con cardiomiopatia dilatata. La durata dello studio è stata di 12 e 24 mesi.

Olsson *et al.* [24] hanno dimostrato un miglioramento continuo e graduale del volume e della funzione del ventricolo sinistro in 12 pazienti con cardiomiopatia dilatata; tuttavia, il gruppo di Olsson ha anche osservato una disfunzione del ventricolo destro e nessun miglioramento della funzione cardiaca.

Un importante studio clinico condotto da Acorn con 300 pazienti ha inizialmente riportato che in seguito all'impianto di un dispositivo di supporto cardiaco si ha una diminuzione del volume diastolico del ventricolo sinistro, un miglioramento della qualità della vita del paziente ed una ridotta probabilità di procedure cardiache future

[25]. Tuttavia, la significatività dello studio è stata criticata per diversi motivi, tra cui un metodo di reclutamento dei pazienti poco chiaro.

Negli studi clinici sono stati evidenziati risultati contrastanti sui reali benefici di un dispositivo di supporto cardiaco, in quanto si è osservato che alcune misure della funzione cardiaca sono migliorate mentre altre sono rimaste invariate, o addirittura, sono peggiorate. Per questo motivo, i risultati devono essere considerati con cautela, ed è necessario avere risultati a lungo termine ed effettuare una maggiore analisi dell’effettivo meccanismo che è alla base del contenimento del ventricolo sinistro.

1.2 Tessuto miocardico ingegnerizzato in vitro

Gli approcci dell’ingegneria dei tessuti sono progettati per riparare tessuti danneggiati mediante l’utilizzo di biomateriali e trapianto di cellule. Numerosi studi hanno focalizzato la propria attenzione nell’esaminare tutti i possibili biomateriali e le migliori condizioni di cultura per creare tessuto miocardico *in vitro* [26-28].

Li *et al.* [29] sono stati i primi a studiare il trapianto di cellule per mezzo di biomateriali per il trattamento della cicatrice infartuale del tessuto miocardio. Il gruppo di Li ha riportato la sopravvivenza di cardiomiociti fetali seminati su mesh di gelatina biodegradabili *in vitro* e impiantati sulla superficie del miocardio secondo il modello *cryoinjury*; tuttavia, l’impianto seminato con le cellule non ha determinato miglioramenti della funzione cardiaca.

Leor *et al.* [30] hanno riportato sia la sopravvivenza che la conservazione della funzione cardiaca mediante scaffold in alginato seminato con cardiomiociti fetali ed impiantato in ratti secondo il modello di infarto miocardico. Si è osservato che l’impianto è stato completamente vascolarizzato e degradato dopo due mesi; tuttavia solo una piccola porzione dell’impianto era costituita da miofibre. Il trapianto dello scaffold da solo non è stato osservato e, quindi, rimane sconosciuto se il miglioramento della funzione cardiaca è dovuto al trapianto del biomateriale o delle cellule.

Kellar *et al.* [31] hanno utilizzato uno scaffold pre-formato, disponibile commercialmente, Dermagraft, contenente fibroblasti dermici umani coltivati su una rete a maglia di poli(glicolide)/poli(lattide). Il trapianto di Dermagraft nel ventricolo

sinistro determina un aumento della frazione di eiezione confrontato con i topi infartuati che non hanno ricevuto alcun trattamento.

Zimmermann *et al.* [32] piuttosto che seminare le cellule su uno scaffold pre-formato, hanno unito cardiomiociti neonatali, collagene liquido di tipo I, matrigel, e mezzo di cultura cellulare e hanno iettato la miscela in uno stampo per ottenere la forma desiderata. In seguito al trapianto sulla superficie dell’epicardio del cuore danneggiato, si è osservato che il tessuto ingegnerizzato era sia vascolarizzato che innervato e contrattile *in vivo* fino ad otto settimane. In questo primo studio, i fasci di muscolo-singolo nel tessuto ingegnerizzato non sono aumentati al di sopra di 100 μm , come è stato osservato invece in molti tessuti ingegnerizzati *in vitro*. In uno studio più recente, questo gruppo ha riportato la formazione di nuovo tessuto miocardico realizzato con questo metodo, con uno spessore di 450 μm , che ha dimostrato di essere in grado di migliorare la funzione sistolica e diastolica in ratti. Cinque impianti circolari sono stati messi in pila di traverso per ottenere un impianto da 1 a 4 mm di spessore che è stato conseguentemente impiantato sulla superficie dell’epicardio dell’infarto. Anche se non riportato, probabilmente si è verificata una necrosi all’interno dell’impianto a causa di una significativa diminuzione dello spessore dopo il trapianto. Gli impianti sono stati sottoposti a cultura in ambiente arricchito di ossigeno ed insulina, che può aver permesso la formazione di tessuto *in vitro* di spessore superiore ai classici 100 μm .

Kuprick *et al.* [33] hanno unito le cellule con una miscela di collagene e matrigel. Cellule mesenchimali del midollo osseo sono state in un primo momento sospese nel gel, in seguito seminate in una rete porosa non-woven di acido poli-L-lattico ed, infine, rinforzate con uno strato di poli(tetrafluoroetilene). Il tessuto ingegnerizzato invece di essere impiantato sulla superficie dell’epicardio, è stato suturato nella parete dell’infarto dopo una ventricolotomia. Non è stato osservato alcuna dilatazione aneurismatica in seguito all’impianto di questo scaffold multi-materiale.

Kofidiz *et al.* [34] hanno miscelato cellule staminali embrionali e collagene di tipo I per formare un costrutto tessutale *in vitro*, che è stato successivamente impiantato nella parete dell’infarto mediante chirurgia, creando una sacca interna nel cuore eterotopico di ratto. Il trapianto delle cellule hanno dato luogo ad impianti vitali che prevengono l’ispessimento della parete dell’infarto e migliorano la diminuzione frazionaria confrontati con animali che hanno ricevuto scaffold senza cellule o nessun trattamento.

Come osservato in altri metodi di ingegneria dei tessuti *in vitro*, la maggioranza dei costrutti di tessuto miocardico hanno uno spessore massimo di 100 μm . Studi condotti sia da Zimmermann *et al.* [32] che da Miyahara *et al.* [35] hanno dimostrato la creazione *in vivo* di tessuti di circa mezzo millimetro di spessore. Nello studio condotto da Zimmermann l’aumento dello spessore del tessuto è stato attribuito a migliori condizioni di cultura, Miyahara *et al.* hanno, invece, trapiantato un monostrato cellulare che si è in seguito espanso *in vivo* per formare un impianto più grande. Il monostrato di cellule staminali mesenchimali ha prodotto solo pochi cardiomiociti, ma questo studio dimostra la capacità di espansione *in situ* delle cellule staminali nel miocardio.

Sebbene questi studi offrono una speranza di creare costrutti per rigenerare tessuti utilizzando l’approccio *in vitro*, l’attuale spessore di mezzo millimetro raggiunto probabilmente non può produrre grandi cambiamenti nel miocardio umano, che è significativamente più grande rispetto al miocardio di un ratto. Per questo motivo, la principale sfida dell’ingegneria dei tessuti è di sviluppare un costrutto di tessuto cardiaco *in vitro* per essere umani.

1.3 Tessuto miocardico ingegnerizzato in situ

Il trapianto di cellule può essere considerato il primo esempio di ingegnerizzazione del tessuto cardiaco *in situ*. La cardiomioplastica consiste nel trapianto di cellule vive per sostituire cardiomiociti necrotici. Sebbene diversi studi hanno mostrato miglioramenti della performance cardiaca utilizzando il trapianto di cellule, ci sono diversi problemi associati con questa tecnologia. La tecnica di trapianto delle cellule consiste nella somministrazione di cellule in soluzione acquosa mediante iniezione endovenosa, intracoronarica o iniettate direttamente nel miocardio; queste tecniche presentano problemi di limitata ritenzione e sopravvivenza delle cellule [36-38]. Sono stati riportati pochi lavori riguardo il trapianto di cellule in animali, e comunque, il numero di casi di successo dell’impianto sono pochi. Inoltre, dato che le cellule vengono iniettate nella regione ischemica del cuore, vi è poca se non nessuna vascolatura da fornire alle cellule impiantate. La sopravvivenza delle cellule è, quindi, limitata dalla mancanza di ritenzione e di vascolarizzazione. Un altro problema associato alla tecnica riguarda la scarsa distribuzione delle cellule. La sezione trasversale dell’area dell’infarto mostra dei

cluster delle cellule inoculate tra la cicatrice del tessuto infartuato. La migrazione verso la regione infartuata è, quindi, un problema visto che le cellule rimangono in un'area isolata e possono provocare un ambiente eterogeneo pro-aritmico [39]. Inoltre, il tradizionale trapianto di cellule consiste nell'iniezione di cellule in una soluzione completamente liquida e, quindi, non fornisce alle cellule trapiantate un supporto temporaneo a cui aderire, in quanto non è contemplato l'utilizzo di biomateriali.

Il campo emergente dell'ingegneria dei tessuti ha dato forti speranze per una possibile alternativa alla cardiomioplastica. Sebbene la realizzazione di tessuto miocardico ingegnerizzato *in vitro* ha mostrato promettenti risultati, le limitazioni legate a tale tecnica, descritte precedentemente, hanno spinto gli studiosi a focalizzarsi nello sviluppo dell'approccio dell'ingegneria dei tessuti *in situ* per il riparo del miocardio. L'approccio *in situ* utilizza un biomateriale iniettabile per rilasciare le cellule direttamente nella parete dell'infarto per aumentare la sopravvivenza cellulare. E' anche possibile utilizzare biomateriali iniettabili senza cellule sia come sostegno alla parete del ventricolo sinistro in modo da prevenire un rimodellamento negativo in seguito all'infarto miocardico, sia come sistema di rilascio controllato di agenti terapeutici al miocardio ischemico. Un trattamento iniettabile è molto meno invasivo rispetto all'impianto di un tessuto ingegnerizzato *in vitro* ed è per tale motivo più *appealing* da un punto di vista clinico.

Christman *et al.* [40] sono stati i primi a dimostrare una maggiore sopravvivenza cellulare nel momento in cui le cellule vengono rilasciate mediante uno scaffold iniettabile rispetto alla tecnica di cardiomioplastica tradizionale. E' stato dimostrato che la colla di fibrina, un biopolimero iniettabile, è in grado di indurre neovascolarizzazione all'interno del miocardio ischemico e ridurre l'espansione dell'infarto. Un'osservazione molto interessante fatta dal gruppo è che un'iniezione di colla di fibrina, con o senza mioblasti scheletrici, preserva la geometria del ventricolo sinistro e la funzione cardiaca in un modello di infarto miocardico acuto [41].

Ryu *et al.* [42] hanno dimostrato gli effetti benefici di uno scaffold iniettabile di colla di fibrina contenente cellule mononucleari del midollo osseo. Anche questo gruppo ha riportato un miglioramento della neovascolarizzazione nel miocardio ischemico, che è stato ulteriormente confermato da Huang *et al.* [43].

Chekanov *et al.* [44] hanno, invece, dimostrato un miglioramento della funzione cardiaca e della neovascolarizzazione utilizzando una matrice di fibrina con cellule endoteliali rispetto ai controlli salini; tuttavia, l’iniezione della fibrina da sola o di cellule endoteliali sane da sole non è stata esaminata. Per tale motivo, è difficile concludere cosa ha causato il miglioramento. Recentemente, è stato inoltre considerato l’utilizzo della colla di fibrina per il trattamento dell’aneurisma cronico come conseguenza dell’infarto miocardico.

Christman *et al.* hanno dimostrato che un’iniezione di colla di fibrina nell’aneurisma, in seguito ad infarto miocardico, ristabilisce la geometria del ventricolo sinistro e ne migliora significativamente la funzione [45]. Sebbene a cinque settimane dopo l’infarto, i miglioramenti della funzione del ventricolo sinistro non sono stati mantenuti, è stato comunque osservato l’arresto della dilatazione del ventricolo sinistro e del suo deterioramento.

Thompson *et al.* [46] hanno dimostrato con successo l’utilizzo di collagene con cellule del midollo osseo iniettato nel miocardio via catetere; tuttavia, l’iniezione è stata fatta nel cuore lesionato e non è stato fatto il confronto con l’iniezione delle cellule disperse nella soluzione liquida.

Dai *et al.* [47] ha iniettato collagene nel miocardio infartuato ma come terapia senza cellule. Ha riportato un miglioramento della geometria del ventricolo sinistro e della funzione cardiaca senza però alcun aumento della vascolarizzazione confrontato con il controllo salino. Al contrario, Huang *et al.* [43] hanno riportato un aumento della densità capillare in seguito all’iniezione del collagene ed un’infiltrazione di miofibroblasti.

Recentemente, Leor *et al.* [48] hanno suggerito che l’iniezione intramiocardica di alginato induce neovascolarizzazione e migliora la funzione del ventricolo sinistro.

Kofidis *et al.* [49] hanno studiato un approccio *in situ* utilizzando matrigel per rilasciare cellule staminali embrionali di topo. Con lo stesso metodo usato *in vitro*, hanno formato una sacca nel ventricolo sinistro al cui interno hanno iniettato il gel. Sono riusciti a dimostrare un miglioramento della funzione del ventricolo sinistro negli animali che hanno ricevuto la miscela matrigel-cellule rispetto al caso degli animali che hanno ricevuto solo il biomateriale o solo le cellule disperse nel mezzo di cultura.

Huang *et al.* [43] hanno inoltre dimostrato un aumento della vascolatura nel miocardio infartuato in seguito all'iniezione di matrigel.

Zhang *et al.* [50] hanno utilizzato una miscela di matrigel, collagene e cellule in mezzo di cultura per rilasciare cardiomiociti, molto simile al sistema utilizzato da Zimmermann *et al.* [32] *in vitro* e sono riusciti a preservare la geometria del ventricolo sinistro e la funzione cardiaca.

Davis *et al.* [51] hanno sviluppato un nuovo scaffold iniettabile per il miocardio utilizzando peptidi *self assembling* che formano nanofibre dopo l'iniezione creando un microambiente idoneo per la crescita delle cellule e dei vasi sanguigni. Inoltre, sono stati iniettati anche cardiomiociti neonatali con le nanofibre ed è stato osservato un aumento del reclutamento delle cellule endogene. In contrasto, un minore reclutamento è stato osservato nel caso di iniezione di matrigel nel miocardio infartuato.

In conclusione, quindi, questi risultati suggeriscono che matrigel può essere vantaggioso per il rilascio di cellule ma non è ideale per essere utilizzato da solo o come scaffold per promuovere la rigenerazione *in situ*. Peptidi self-assembling, invece, sembrano essere vantaggiosi nel promuovere la rigenerazione ma è necessaria anche un'idonea sorgente di cellule per rigenerare il miocardio. Materiali come alginato, collagene e fibrina hanno dimostrato di essere idonei per il rilascio cellulare e la rigenerazione del miocardio ma non sono ancora stati studiati i loro effetti a lungo termine. Rimane, quindi, ancora non chiaro se i loro effetti benefici persistono per mesi e/o anni dopo la degradazione dello scaffold. Inoltre, il collagene e l'alginato sono noti per la loro instabilità meccanica *in vivo*; per questo motivo, potrebbe essere più vantaggioso l'utilizzo di polimeri iniettabili più rigidi e non degradabili o degradabili più lentamente, che possono prevenire l'arresto cardiaco aumentandone la resistenza meccanica all'infarto e, quindi, prevenire il rimodellamento ed il deterioramento della funzione cardiaca. Allo stesso tempo, però, un polimero troppo rigido potrebbe indurre una disfunzione delle diastole. Risulta, quindi, di fondamentale importanza esaminare attentamente le proprietà meccaniche che dovrebbe avere uno scaffold per essere utilizzato per il riparo dei tessuti cardiaci.

1.4. Limiti dei metodi tradizionali di rigenerazione del miocardio

L'utilizzo di vari tipi di cellule ed i vari approcci dell'ingegneria dei tessuti hanno mostrato miglioramenti della funzione cardiaca nei modelli animali; tuttavia, i meccanismi esatti di ciascun metodo sono ancora sconosciuti. Esistono molte domande e questioni da risolvere prima che questa tecnologia possa essere applicata ai pazienti in maniera sicura. Uno dei maggiori problemi, ad esempio, è quello di trovare una sorgente di cellule idonee per il riparo cardiaco; le difficoltà sono dovute a diversi motivi, tra cui la difficoltà nell'isolamento ed espansione di sorgenti autologhe, l'incapacità di una sorgente di fornire tutti i tipi di cellule necessari e le questioni etiche legate ad alcuni tipi di cellule. Inoltre, vi sono pochi dati che riguardano lo studio dei risultati a lungo termine. Gli studi attuali in genere durano uno o due mesi e per questo motivo, non possono essere indicativi dei risultati a lungo termine.

Nel caso della tecnica della cardiomioplastica è auspicabile che le cellule iniettate siano in grado di migrare verso il tessuto ospite danneggiato, determinando il mantenimento e/o il recupero delle funzioni native. Tuttavia, nella maggior parte dei casi che coinvolgono tessuti danneggiati, la struttura locale non può supportare adeguatamente la semina della sospensione cellulare, rendendo quindi difficile il controllo della forma, dimensione e posizione delle cellule iniettate. La causa maggiore è che, anche se numerosi metodi di coltura sono stati sviluppati per diversi tipi di cellule, i metodi tradizionali di raccolta sono ancora piuttosto primitivi. Questi, in genere, consistono nell'utilizzo di enzimi proteolitici, come la tripsina, che degradano le molecole della matrice extracellulare, in modo da permettere il distacco delle cellule. Per tale motivo, questi trattamenti sono anche la causa della degradazione delle proteine di superficie delle cellule il che comporta la perdita della forma e della funzione differenziante da parte delle cellule.

Oltre l'iniezione diretta di una sospensione cellulare, la tecnologia centrale dell'ingegneria dei tessuti riguarda l'utilizzo di scaffold biodegradabili. L'utilizzo di scaffold polimerici per ricostruire organi danneggiati presenta grandi potenzialità data l'esistenza di una grande varietà di polimeri con diverse proprietà strutturali e funzionali idonei per la semina di differenti tipi cellulari, a seconda delle caratteristiche richieste dal tessuto da riparare. In seguito alla degradazione del polimero e la simultanea

proliferazione e migrazione delle cellule, è possibile ottenere una struttura simile al tessuto nativo. Tuttavia, l'utilizzo di questi costrutti (scaffold) hanno avuto solo dei successi limitati a causa di varie complicazioni. Il primo problema riguarda la degradazione del materiale; gli spazi precedentemente occupati dagli scaffold polimerici spesso vengono riempiti da un grande ammontare di matrice extracellulare depositata. Quindi, nel caso di ricreazione di strutture a cellule sparse, tipo cartilagine o tessuto osseo, le strutture realizzate riescono a mimare i tessuti nativi, con un numero relativamente piccolo di cellule e un abbondante ammontare di matrice extracellulare. Tuttavia, nei casi che richiedono strutture densamente cellularizzate, come il cuore o il fegato, i costrutti ingegnerizzati con gli scaffold spesso non riescono a riprodurre bene il tessuto nativo, e possono inoltre determinare casi patologici di fibrosi. In secondo luogo, nel caso di costrutti molto ampi, si osserva spesso che le cellule nella periferia dello scaffold sono in genere in buona salute e mimano il tessuto nativo; le cellule che si trovano al centro del costrutto, invece, determinano un core necrotico. A causa dei limiti della diffusione passiva, sia il rilascio di nutrienti che la rimozione dei rifiuti metabolici sono ostacolati, determinando la conseguente perdita della vitalità cellulare. Per tali motivi, questi metodi spesso danno luogo a tessuti ingegnerizzati inadeguati.

Comunque, lo svantaggio più grande nell'utilizzo di scaffold, è la forte reazione infiammatoria che esso induce in seguito alla sua biodegradazione. E' stato precedentemente osservato che l'impianto di quasi tutti i materiali polimerici, anche se non tossici, causa una risposta infiammatoria non specifica [52]. Per tale motivo, durante la risposta iniziale di cicatrizzazione della ferita, si ha una migrazione verso il sito dell'impianto di macrofagi e neutrofili attivati con collagenase ed elastase. Questa reazione infiammatoria da parte del tessuto ospite può danneggiare le cellule trapiantate, incluse le popolazioni staminali e progenitrici utilizzate per la semina, risultando, quindi, nel fallimento del tessuto ingegnerizzato [53]. Nel caso di materiali biologici, come collagene e gel di fibrina, la loro biodegradazione può somigliare molto alla risposta naturale di cicatrizzazione di una ferita, determinando la migrazione delle cellule infiammatorie nel sito dell'impianto e nello scaffold. Anche se l'acido polilattico (PLA) o poliglicolico (PGA) sono spesso utilizzati in quanto possono essere rimossi dal corpo umano dai normali processi metabolici, tuttavia si osservano danni significanti nel sito dell'impianto dovuti alla loro composizione acida. Nei casi di degradazione

molto veloce del PLGA è stato osservato che è presente un effetto negativo dell'ambiente acido determinato dalla degradazione del polimero [54]. Probabilmente, il pH acido è creato al sito dell'impianto sia a causa dell'integrazione delle cellule nello scaffold in PLGA sia a causa di una marcata diminuzione della vitalità cellulare. Sebbene la vitalità cellulare all'interno dello scaffold può essere migliorata riducendo la cinetica di degradazione dei materiali, si ha comunque una risposta infiammatoria a lungo termine dovuta alla formazione di *giant cells* nel corpo estraneo. I macrofagi attivati sono stati osservati attaccare le superficie dei polimeri impiantati mediante la secrezione di sostanze che sono probabilmente un'ulteriore risposta del tessuto ospite in seguito alla fase acuta dell'infiammazione. Sebbene questi macrofagi e le *giant cells* giocano un ruolo chiave nella biodegradazione del materiale impiantato, la loro presenza sulla superficie del polimero determina anche un grave danno alle cellule all'interno dello scaffold ed ai tessuti ospiti circostanti. Per tale motivo, anche se i polimeri biodegradabili utilizzati possono essere non tossici e meccanicamente non invasivi, gli effetti negativi dovuti alla loro biodegradazione limitano significativamente la loro applicabilità.

L'utilizzo dei biomateriali per l'ingegnerizzazione *in situ* del tessuto cardiaco è stato preso in considerazione sia come soluzione senza cellule sia come una terapia ibrida, in combinazione con cellule e agenti terapeutici. I biomateriali possono essere utilizzati *in situ* per aumentare lo spessore della parete, ristabilire la geometria e provvedere ad un supporto strutturale del ventricolo sinistro danneggiato. Il corpo umano potrebbe funzionare da bioreattore e permettere l'infiltrazione delle cellule all'interno dello scaffold per rigenerare il muscolo cardiaco ed i vasi sanguigni. Affinché l'ingegnerizzazione *in situ* del tessuto miocardico diventi un'opzione fattibile di trattamento del miocardio danneggiato, è necessario che i biomateriali influenzino specificamente il microambiente del miocardio. Questi materiali dovrebbero essere progettati per migliorare il reclutamento delle cellule progenitrici del muscolo cardiaco e della vascolatura del miocardio, ed aumentare la durata della funzione del ventricolo sinistro. Un importante fattore, quindi, per il successo dei biomateriali come trattamenti per il miocardio è il controllo della risposta del tessuto dopo l'impianto o l'iniezione [55]. Un altro fattore che influenza la scelta di un biomateriale riguarda la sua abilità nell'essere completamente sterilizzato. Risulta anche molto importante prendere in

considerazione l'abilità delle cellule di aderire, sopravvivere e migrare all'interno del biomateriale scelto per rigenerare il tessuto miocardico. Materiali sintetici idrofobici quasi immediatamente sono capaci di assorbire proteine che possono poi mediare l'attacco e la migrazione cellulare. Materiali di origine biologica, come la colla di fibrina ed il collagene, contengono già delle sequenze di peptidi a cui le cellule possono aderire mediante le integrine. I materiali sintetici possono anche essere modificati con questi peptidi o altre molecole in modo da mimare al meglio il tessuto nativo [56]. Questi tipi di materiali, chiamati biomimetici, non sono stati ancora esaminati per il miocardio, ma potrebbero dimostrarsi molto utili per migliorare l'adesione cellulare, la vitalità e il controllo della risposta del tessuto ospite.

1.5. Nuovi approcci dell'ingegneria dei tessuti per la rigenerazione del miocardio

1.5.1. Cell sheet engineering

Per andare incontro all'esigenza di idee nuove il gruppo di Okano dell'Università di Tokio, ha sviluppato un nuovo metodo per la rigenerazione dei tessuti mediante l'utilizzo di piastre termoresponsive per coltura, realizzate con un polimero termoresponsivo, il poli(N-isopropilacrilamide) (PIPAAm), come alternativa alle tradizionali piastre di coltura per tessuti [57,58]. Sotto le normali condizioni di coltura, a 37°C, la superficie della piastra è relativamente idrofobica e le cellule si attaccano, diffondono, e proliferano così come sulle tradizionali piastre di coltura. Quando la temperatura scende al di sotto della temperatura critica del polimero (LCST) di 32°C, la superficie della piastra in PIPAAm diventa idrofilica e rigonfia, formando uno strato di idratazione tra la superficie della piastra e le cellule coltivate; ciò permette il loro spontaneo distacco senza la necessità di utilizzare trattamenti enzimatici come la tripsinizzazione. Evitando trattamenti proteolitici le proteine di superficie, critiche delle cellule quali ad esempio i canali ionici, i recettori dei fattori di crescita e le proteine per le giunzioni cellula-cellula, rimangono intatte, e le cellule possono essere raccolte in maniera non invasiva come fogli intatti insieme alla loro matrice extracellulare (ECM) e utilizzati per applicazioni nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti [59] (Fig. 3).

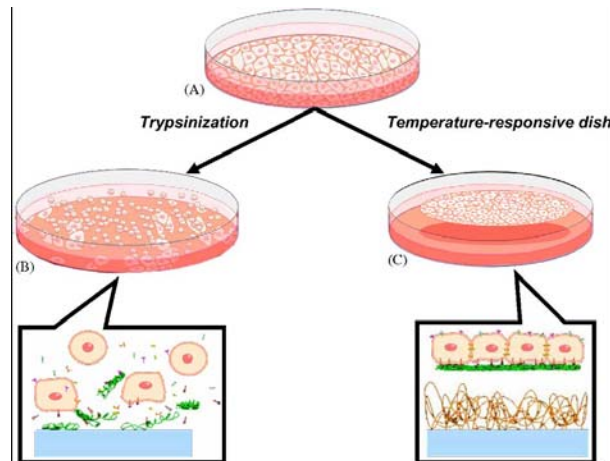


Fig. 3: Piastre per coltura termoresponsive. (A) Durante la coltura cellulare, le cellule depositano molecole della matrice extracellulare (ECM), e formano giunzioni cellula-cellula. (B) Con la tradizionale tecnica proteolitica di raccolta per tripsinizzazione, sia l'ECM che le proteine di giunzioni cellula-cellula sono degradate per recuperare le cellule. (C) Al contrario le cellule raccolte dalle piastre termoresponsive sono recuperate come fogli intatti insieme con la ECM da loro depositata, attraverso la semplice riduzione di temperatura.

Dal momento che la ECM rimane intatta sulla superficie dei fogli di cellule [60], essi possono essere direttamente trapiantati in un difetto del tessuto o anche giustapposti per creare strutture 3D simili ad un tessuto. Questo approccio, pertanto, fornisce vari vantaggi rispetto alle tradizionali terapie rigenerative di iniezione cellulare e ricostruzione di tessuti con scaffold biodegradabili. Con l'utilizzo di singole sospensioni cellulari, c'è spesso una significativa perdita di cellule, e solo una piccola percentuale di esse riescono a rimanere ancorate al sito di interesse. Inoltre, nel caso di tessuti danneggiati, le cellule iniettate sono spesso incapaci di aderire ai siti in cui l'architettura ospite è distrutta. Al contrario i "fogli" di cellule attraverso l'ECM depositata possono aderire al tessuto ospite e ai siti danneggiati con la minima perdita di cellule. Un problema chiave nell'utilizzo di scaffold polimerici biodegradabili per la ricostruzioni di alcuni tessuti, è, invece, la reazione infiammatoria che avviene dopo il loro impianto e la loro biodegradazione [61]. Infatti, la degradazione se da un lato corrisponde all'integrazione del costruito ingegnerizzato nel tessuto dall'altro canto può creare danni alle cellule seminate nello scaffold. Inoltre, malgrado i notevoli successi nella ricostruzione di alcuni tessuti come osso e cartilagine, l'uso di scaffold biodegradabili spesso non può adeguatamente riprodurre la densità cellulare che è richiesta da tessuti come fegato, cuore o rene. Dal momento che l'architettura dettagliata di molti tessuti può essere pensata come formata da cellule densamente impacchettate con poca ECM, la ricostruzione di tessuti utilizzando i "fogli" di cellule e matrice di Okano può essere

compiuta in tre modi generali. Il primo consiste nel trapiantare singoli “fogli” direttamente nel tessuto ospite come nel caso della pelle [62], l’epitelio della cornea [63], la vescica dell’urotelio [64, 65] e i legamenti periodontali [66] (Fig. 4a). Il secondo caso consiste nella giustapposizione di fogli di cellule omotipiche usati per ricreare strutture 3-D come il muscolo cardiaco [67] (Fig. 4b) e i muscoli lisci [68]. L’ultimo caso consiste, invece, nella stratificazione di differenti fogli di cellule, per ricreare strutture più complesse come i lobuli del fegato [69] e i glomeruli del rene (Fig. 4c).

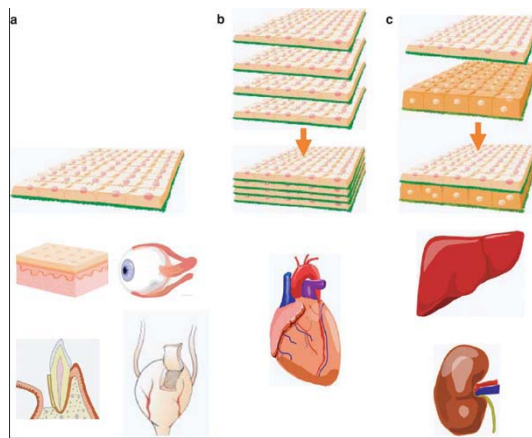


Fig. 4: terapie rigenerative basate sulle cellule usando fogli di cellule ingegnerizzati. A) attraverso il trapianto di singoli fogli di cellule possono essere ricreati l’epidermide della pelle, l’epitelio della cornea, la vescica dell’urotelio e i legamenti periodontali. B) attraverso la giustapposizione omotipica di fogli di cellule può essere ricreato il tessuto del miocardio. C) attraverso la stratificazione eterotipica di vari fogli di cellule possono essere ricreate strutture più complesse come i lobuli del fegato

In particolare, nell’ingegnerizzazione del tessuto miocardico, si possono realizzare *in vitro* tessuti cardiaci funzionali giustapponendo fogli di cardiomiociti raccolti dalle piastre termoresponsive [67]. Una volta giustapposti, i singoli fogli di cellule si integrano per formare un singolo, continuo, tessuto densamente cellularizzato che assomiglia al muscolo cardiaco nativo. Questo costrutto 3D costituito da fogli di cardiomiociti stratificati è stato trapiantato nel cuore ed è stato in grado di formare connessioni morfologiche con esso; il trapianto è stato pertanto in grado di riparare il muscolo cardiaco danneggiato [70].

Nel muscolo cardiaco nativo, le cellule sono notevolmente dense con diffuse congiunzioni dei *gap*, permettendo in questo modo la trasmissione elettrica che risulta nella pulsazione sincrona del cuore intero. Per tale motivo, la creazione ed il

mantenimento di comunicazioni intercellulari attraverso le congiunzioni dei *gap* è estremamente importante e rende anche i cardiomiociti notevolmente sensibili alla distruzione delle connessioni vitali cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare associate con il metodo di raccolta proteolitico. In aggiunta, mentre i metodi precedenti che utilizzano scaffold in collagene [71], acido poliglicolico (PGA) [72], e gelatina [73] hanno prodotto alcuni risultati positivi nella formazione di un tessuto contrattile, i costrutti realizzati in genere contengono cardiomiociti vitali nella periferia, ma una significativa necrosi al centro. Per tale motivo, i tessuti miocardici creati mediante l'utilizzo di scaffold biodegradabili spesso mostrano cellule che sono molto meno compatte ed hanno una forza contrattile minore confrontati con il tessuto nativo.

Mediante l'utilizzo della tecnologia d'ingegnerizzazione di *cell sheet* è possibile ricreare il tessuto cardiaco attraverso la giustapposizione di fogli di cardiomiociti che mostrano una pulsazione spontanea *in vitro* e possono aderire tra loro grazie alla presenza della matrice extracellulare depositata. Dato che i trattamenti proteolitici di raccolta delle cellule vengono evitati con tale metodo, è possibile conservare le proteine di superficie vitali per le cellule, come la connessina necessaria per il battito sincrono presente nel tessuto nativo. Inoltre, evitando l'utilizzo di scaffold, i fogli di cardiomiociti possono essere giustapposti l'un l'altro creando costrutti 3D con diffuse congiunzioni dei *gap* presenti in tutto il costrutto. Queste strutture densamente cellularizzate contengono meno matrice extracellulare e sono molto più simili ai tessuti nativi se confrontati con i costrutti ottenuti utilizzando scaffold biodegradabili. La formazione di congiunzioni dei *gap* nella giustapposizione dei fogli di cellule permette, inoltre, una comunicazione elettrica che determina delle pulsazioni funzionali e sincronizzate nell'impianto 3D del tessuto miocardico che possono essere osservate macroscopicamente.

Un costrutto formato dalla giustapposizione di quattro fogli di cardiomiociti, è stato impiantato nel tessuto subcutaneo di ratti aritmici e si è visto che tale costrutto ha aderito direttamente al tessuto ospite ed ha dimostrato di essere in grado di determinare un battito macroscopico *in vivo*. I costrutti sono stati resecati quattro settimane dopo l'impianto ed hanno mostrato la formazione di tessuti molto simili al tessuto cardiaco nativo e la formazione di un network microvascolare nel costrutto pulsatile, che indica una buona integrazione con l'animale ospite. Inoltre, i battiti macroscopici determinati

dal costruito a quattro fogli impiantato sono stati confermati fino ad un anno dall'impianto, dimostrando la loro abilità nella sopravvivenza a lungo termine.

Recenti risultati si sono ottenuti anche utilizzando fogli di cellule staminali mesenchimali che hanno determinato funzioni cardiache migliori dopo l'infarto del miocardio [35]. L'uso di tali fogli ha permesso di evitare l'assottigliamento della parete del muscolo cardiaco e migliorare la sopravvivenza dell'animale dopo il danno subito al miocardio. Successivamente al trapianto è stata osservata una crescita cellulare nei fogli di cellule staminali mesenchimali trapiantati e differenziazione delle cellule staminali in cardiomiociti. Quindi, il rilascio di cellule sotto forma di tessuti 3D, creati attraverso la tecnica dei fogli di cellule, rappresenta un'importante possibilità nello sviluppo della medicina rigenerativa. Tuttavia, anche se Okano *et al.* hanno dimostrato di riuscire a ricostruire il tessuto miocardico attraverso la giustapposizione di fogli di cardiomiociti, il problema della diffusione dei nutrienti e della rimozione dei prodotti di scarto metabolici legata allo spessore dei costrutti ingegnerizzati rimane comunque un limite da superare. Per risolvere questo problema Okano *et al.* hanno proposto un metodo polichirurgico che consiste in trapianti ripetuti ad intervalli di tempo che permettano la neovascolarizzazione (Fig. 5) [74].

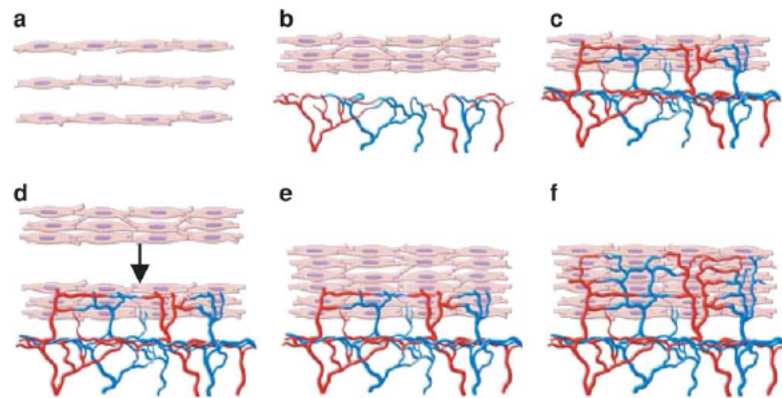


Fig. 5: Polichirurgia per creare tessuti miocardiici vascolarizzati spessi. A) singoli fogli di cardiomiociti sono raccolti dalle piastre di coltura termoresponsive e prelevati per creare costrutti stratificati. B) triplo strato di fogli di cardiomiociti sono impiantati subcutaneamente. C) dopo il trapianto avviene la neovascolarizzazione nel tessuto bioingegnerizzato. D) dopo che una sufficiente neovascolarizzazione è avvenuta, un secondo strato triplo di fogli di cardiomiociti è trapiantato direttamente sopra al primo costrutto. E) la neovascolarizzazione del secondo innesto avviene attraverso il primo costrutto, al fine di creare tessuti spessi che possano superare i limiti della diffusione passiva.

Usando questo metodo una tripla sovrapposizione di fogli di cardiomiociti sono stati trapiantati 10 volte a intervalli di 1 giorno per poter produrre un tessuto miocardico altamente cellularizzato spesso 1mm (Fig. 6). Questi tessuti spessi mostrano pulsazioni sincrone e lo sviluppo di un network microvascolare ben organizzato.

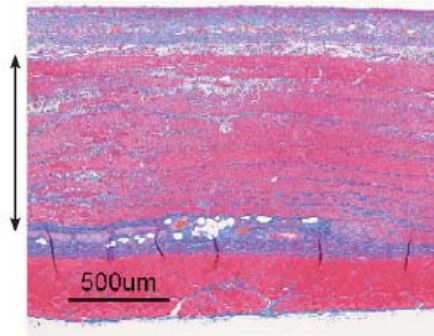


Fig 6: ingegnerizzazione di un tessuto miocardico spesso 1mm utilizzando la tecnica della polichirurgia, un tessuto miocardico, con battito cardiaco sincrone, spesso approssimativamente 1 mm può essere ingegnerizzato in vivo.

Sebbene la tecnologia cell sheet sia in grado di superare molti dei problemi legati ai tradizionali metodi dell'ingegneria dei tessuti, ci sono ancora molte questioni da risolvere. Per quasi tutte le applicazioni dell'ingegneria dei tessuti il limite fondamentale per il loro successo riguarda la sorgente delle cellule. L'utilizzo di sorgenti di cellule autologhe è la scelta in genere preferita per evitare il bisogno di immunospressione a lungo termine. Sebbene le nuove tecnologie permettano la differenziazione delle cellule staminali embrionali in diversi tipi di cellule, i fattori regolatori e la cascade di segnali coinvolti in questi processi non sono stati ancora ben compresi e la loro applicazione potrebbe essere ulteriormente ritardata a causa di considerazioni etiche. Per tale motivi, la scoperta di sorgenti alternative di cellule per la fabbricazione non solo di fogli di cellule ma per tutti i costrutti dell'ingegneria dei tessuti è di primaria importanza.

Inoltre, come precedentemente accennato, una restrizione chiave nella progettazione di costrutti mediante l'utilizzo di scaffold, riguarda i limiti nella diffusione passiva che previene il rilascio di nutrienti e causa un accumulo di rifiuti metabolici. Per quanto concerne la tecnologia dei fogli di cellule, il numero di fogli di cellule che possono essere sovrapposti in maniere efficiente senza provocare un'ischemia o un'ipossia al centro del costrutto, è, quindi, limitato. Tale problema rimane un ostacolo significativo,

quindi, nella ricostruzione di tessuti 3D, spessi e vitali. Il gruppo di Okano sta cercando di superare tale problema coltivando epatociti e cardiomiociti con cellule endoteliali in modo da ricreare un network microvascolare all'interno del tessuto ingegnerizzato.

1.5.2. Microsfere per il rilascio di tessuti e cellule

Le colture su microcarriers furono introdotte da van Wezel nel 1967 [75] per realizzare produzioni di massa di vaccini virali e prodotti cellulari biologici usando le cellule dei mammiferi. In seguito, per produrre prodotti biologici in scala industriale, sono stati utilizzati diversi microcarriers commercialmente disponibili [76].

Nelle colture di microcarriers, le cellule ad ancoraggio dipendente crescono su piccole microsfere tenute in sospensione in appositi sistemi di coltura denominati spinner flask. Le cellule, differenziate o non, crescono sulla superficie dei microcarriers e possono essere poi raccolte in grande numero per successivi impianti e analisi. Un importante vantaggio di questa tecnologia è che le cellule seminate su questi microcarriers possono essere rilasciate direttamente al sito che deve essere riparato. Aggregati di microcarriers possono essere iniettati o somministrati per via artroscopica, in maniera tale da eliminare la necessità di riseminare le cellule raccolte in uno scaffold.

I microcarriers offrono il vantaggio di mettere a disposizione un'elevata area superficiale per la crescita di monostrati di cellule durante la propagazione in un sistema di coltura in sospensione: un grammo di microcarriers facilmente fornisce un'area superficiale comparabile a 15 flasche per coltura di 75 cm². Questo sistema di coltura, pertanto, offre un effettivo risparmio di spazio e costi rispetto all'utilizzo di mezzo di coltura e costosi additivi come i fattori di crescita e il siero. Inoltre, le tecniche di coltura con microcarriers facilitano un più efficiente trasferimento dell'ossigeno ed il mantenimento dell'ambiente fisico, biologico e chimico. Questo sistema può essere regolato e monitorato per il pH e il pO₂ desiderato, i livelli di shear, l'agitazione e i nutrienti; di conseguenza, una regolazione rigorosa dei processi distinti di proliferazione cellulare e differenziazione può essere ottenuta. Analisi periodiche di piccoli campioni di cellule possono essere fatte con il minimo disturbo e senza sacrificare l'intera massa di microcarriers seminati [77]. Vari fattori sono cruciali perché l'applicazione dei microcarriers nell'ingegneria dei tessuti abbia successo. Le cellule sui

microcarriers crescono come monostrati sulla superficie di piccole sfere (Fig 7a e b) o come multistrati nei pori di strutture macroporose (Fig 8 A, B e C).

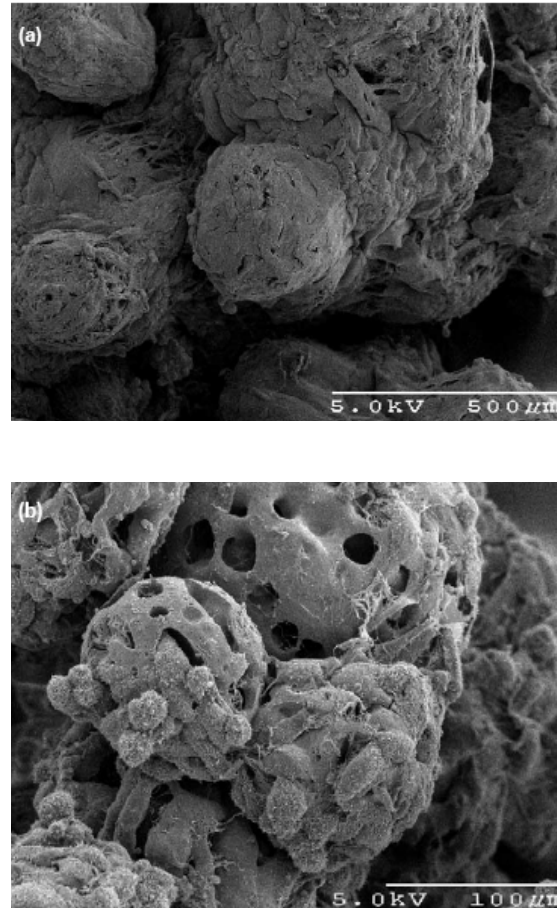
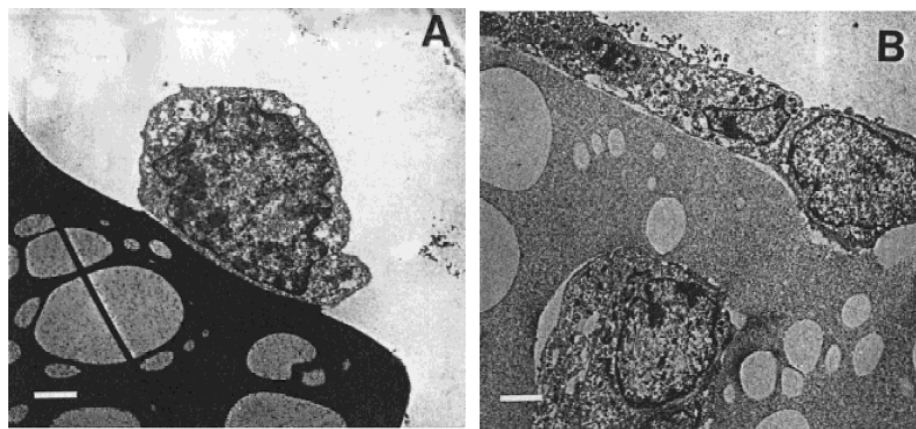


Fig. 7. Immagini SEM di cellule staminali mesenchimali umane coltivate su microcarriers Culti-Spher dopo 3 settimane di coltura [77].



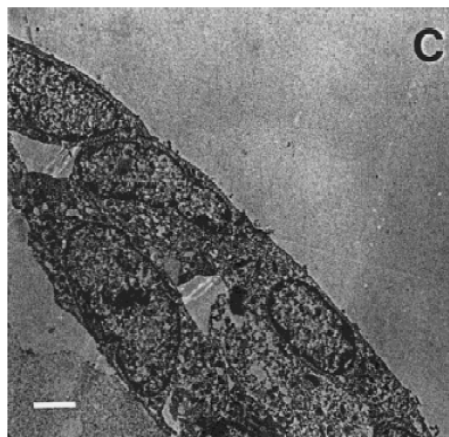


Fig. 8: Immagini TEM di sezioni ultrasottili di microbiglie di gelatina Culti-Spher G seminate con cellule HepZ. A) cellula ancora di forma rotonda poco dopo la semina. B) dopo l'attaccamento le cellule cominciano ad appiattirsi e ad incrementare il volume del citoplasma. C) le cellule cresciute esponenzialmente esibiscono una morfologia stesa sulla superficie e una forma sferica nei macropori nell'ultima fase di crescita e nell'ultima fase di crescita formano dei multistrati [78].

L'adesione delle cellule alla superficie di coltura è fondamentale sia nelle tradizionali tecniche di coltura in 2D che nelle colture con microcarriers. Poiché la proliferazione delle cellule ad ancoraggio dipendente può avvenire solo dopo l'adesione ad una superficie di coltura idonea [79], è importante utilizzare superfici e procedure di coltura che favoriscono tutti gli step coinvolti nell'adesione. L'adesione delle cellule avviene in 4 fasi differenti. La prima fase consiste in una leggera adesione alla superficie. La seconda fase mostra cellule più appiattite ma ancora di forma sferoidale, dove la cellula è significativamente più adesa grazie all'incrementata area superficiale di contatto e alla densità del legame. Le cellule nella terza fase sono significativamente meno adesive che quelle nella fase due a causa del numero ridotto di legami. Le cellule nella quarta fase sono pienamente adese e estremamente appiattite (Fig. 9). L'adesione delle cellule nelle colture è un processo multistep e coinvolge a) l'adsorbimento dei fattori di adesione alla superficie di coltura, b) il contatto tra le cellule e la superficie, c) l'adesione delle cellule alla superficie rivestita, e infine d) lo *spreading* (distensione) delle cellule (Fig. 9) [80].

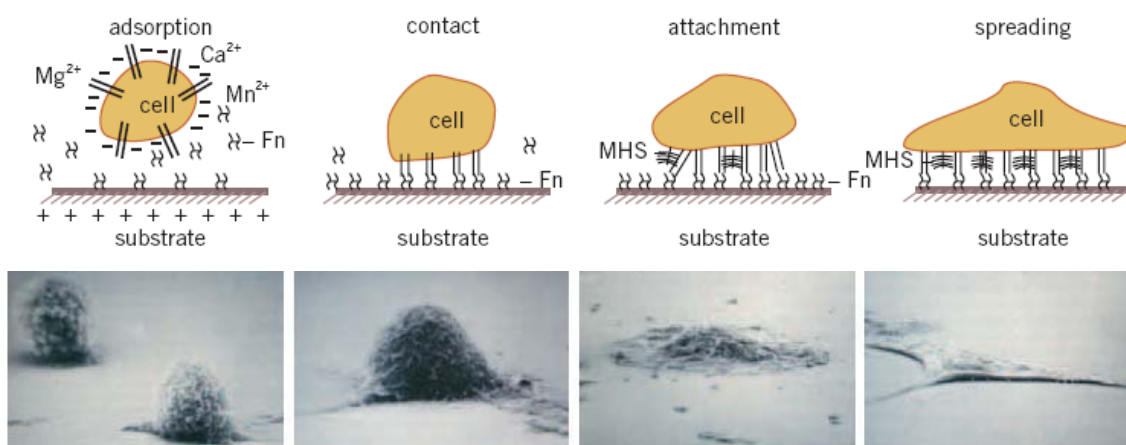


Fig. 9. Sopra: disegno schematico del processo di adesione in 4 fasi (Fn - fibronettina, MHS - heparan solfato multivalente), Sotto: immagine microscopica delle 4 fasi

La facilità con la quale le cellule aderiscono alla superficie dei microcarriers dipende dalla composizione chimica, dalla topografia superficiale, dal grado di porosità e dalla densità di carica delle microparticelle. Inoltre, il numero di cellule che aderiscono alla superficie dipende dal diametro dei microcarriers (generalmente tra i 100 e 400 μm). La distribuzione delle dimensioni dovrebbe essere più stretta possibile per assicurare una coltura omogenea, e la densità specifica dei microcarriers dovrebbe essere leggermente più alta di quella del mezzo di coltura per far sì che esse siano mantenute in sospensione con una leggera agitazione. La composizione chimica dei microcarriers determina la facilità di raccolta delle cellule vitali. Enzimi come la tripsina e la collagenase, sono stati usati con successo ma l'efficienza del recupero delle cellule vitali varia a seconda della composizione chimica e del grado di porosità. La composizione chimica determina la biodegradabilità e i microcarriers seminati con le cellule destinati al rilascio direttamente nel sito interessato necessitano di avere un'ottimale velocità di biodegradazione per assicurare una sufficiente longevità *in vivo*. Infine, i microcarriers devono essere in grado di sostenere la sterilizzazione senza che sia compromessa l'integrità strutturale. L'utilizzo di microcarriers macroporosi garantisce una maggiore area superficiale a disposizione per l'adesione delle cellule il che incrementa l'adesione cellulare. Inoltre, le strutture macroporose sono in grado di proteggere le cellule dalle forze di shear. Sotto determinate condizioni di coltura, le cellule seminate sui microcarriers hanno dimostrato di essere in grado di produrre matrice extracellulare molto simile al tessuto di origine. Tali osservazioni hanno incoraggiato l'utilizzo di sistemi di coltura su microcarrier in spinner flask come modello *in vitro* per studiare la

biologia di tessuti quali ad esempio la cartilagine e l'osso. Inoltre, la scoperta che la produzione *de novo* di un materiale simile al tessuto può essere ottenuta con i microcarriers suggerisce il loro potenziale utilizzo nell'ingegneria dei tessuti. I vantaggi che si ottengono con tale sistema di coltura potrebbero essere anche ricercati nei fattori biomeccanici che favoriscono l'interazione cellula-cellula e riproducono il loro ambiente tridimensionale naturale. Le interazioni cellula-cellula possono essere aumentate con la formazione di aggregati di microcarriers seminati con le cellule [81-84].

Quindi, dal momento che le cellule sono in grado di aderire e crescere sulla superficie delle microparticelle, i costrutti così ottenuti potrebbero essere usati:

- a) come supporti non di carico o come parte di un costrutto 3D;
- b) per la coltura di cellule ad ancoraggio dipendente in un bioreattore dinamico;
- c) per incapsulare molecole bioattive nelle microparticelle e simultaneamente crescere le cellule sulle stesse microparticelle che rilascerebbero fattori di crescita per stimolare la differenziazione e la proliferazione delle cellule adese.

In tal modo la proliferazione cellulare e la differenziazione potrebbe dare origine a un costrutto ibrido cellula-materiale. Dopo il posizionamento del costrutto *in vivo*, la natura biodegradabile delle microparticelle permetterebbe la loro sostituzione con nuovo tessuto formatosi [85].

1.6. Rilascio di fattori di crescita per stimolare la rigenerazione del miocardio

Nelle medicina rigenerativa è senza alcun dubbio assolutamente necessario non solo che il numero di cellule che costituiscono il tessuto sia elevato ma anche che vi sia un supporto strutturale per la proliferazione e differenziazione delle cellule, la cosiddetta matrice extracellulare (ECM). Inoltre, sono spesso richiesti anche dei fattori di crescita per promuovere la rigenerazione dei tessuti, a seconda del tipo di tessuto. I fattori necessari per l'ingegneria dei tessuti sono, quindi, le cellule, uno scaffold per la proliferazione e differenziazione delle cellule e fattori di crescita. In generale, sia per la rigenerazione dei tessuti che per la sostituzione di organi, risulta necessario che le cellule siano in grado di proliferare, differenziare e mantenere la loro funzione biologica. Tuttavia, sono pochi i casi in cui si possono ottenere risultati di successo solo

fornendo le cellule al sito d'interesse. E' noto che la ECM provvede non solo a fornire un supporto fisico alle cellule ma gioca anche un ruolo fondamentale nella proliferazione e differenziazione, o morfogenesi, che determina la rigenerazione dei tessuti e l'organogenesi [86]. E' molto poco probabile che un difetto tissutale di ampia dimensione venga rigenerato e riparato in maniera naturale solo fornendo le cellule al sito d'interesse. Ad esempio, un modo pratico per avere un ambiente idoneo alla rigenerazione tissutale è impiantando nel sito d'interesse una ECM artificiale che supporterà temporaneamente l'adesione cellulare e la successiva proliferazione e differenziazione delle cellule. Come conseguenza, le cellule che si trovano intorno allo scaffold o pre-seminate sullo scaffold, prolifereranno e differenzieranno su di esso se la ECM artificiale è compatibile con le cellule. Una volta che il processo per rigenerare il nuovo tessuto è iniziato, le cellule reclutate nel sito produrranno una ECM naturale ed appropriata. La ECM artificiale dovrebbe, invece, degradare e infine scomparire, contemporaneamente alla produzione della nuova ECM. Esistono molti casi in cui sono necessari dei fattori di crescita per avere applicazioni dell'ingegneria dei tessuti di successo. Tuttavia, l'iniezione diretta di fattori di crescita sotto forma solubile nel sito da rigenerare non è in genere una metodologia effettiva. Questo è dovuto al fatto che i fattori di crescita diffondono rapidamente lontano dal sito di iniezione. Per fare in modo che i fattori di crescita svolgano in maniera efficiente i loro effetti biologici nel sito d'interesse, è necessario utilizzare un sistema di rilascio controllato. E' infatti possibile ottenere un rilascio controllato di fattori di crescita per un periodo di tempo esteso se questi vengono incorporati in carrier appropriati. In questo modo, il fattore di crescita è protetto dalla sua proteolisi, almeno fin quando si trova all'interno del carrier, per avere una prolungata attività *in vivo*. Il carrier per il rilascio dovrebbe degradarsi nel corpo umano in quanto non è più necessario una volta che il rilascio sia completato. Per tale motivo, nelle applicazioni dell'ingegneria dei tessuti e della sostituzione di organi, è di primaria importanza creare un ambiente idoneo all'induzione della rigenerazione tissutale mediante l'utilizzo di scaffold biodegradabili e la tecnologia dei sistemi di rilascio controllato.

Diversi studi sono stati riportati riguardo alla rigenerazione tissutale utilizzando fattori di crescita incapsulati all'interno di carrier polimerici (Tab. 2) [87].

<i>Growth factor</i>	<i>Carrier</i>	<i>Animal</i>	<i>Tissue regenerated</i>
BMP	PLA	Dog	Long bone
	Collagen sponge	Rat	Long bone
	Collagen sponge	Dog, monkey	Periodontal ligament and cementum
	β -TCP	Rabbit	Long bone
rhBMP-2	Porous HA	Rabbit	Skull bone
	Porous PLA	Dog	Spinal bone
	Porous PLA	Rat	Skull bone
	PLA microsphere	Rabbit	Skull bone
	Collagen sponge	Dog	Periodontium
	Gelatin	rabbit	Skull bone
	PLA-coating gelatin sponge	Dog, monkey	Long bone, jaw bone, skull bone
	Porous HA	Monkey	Skull bone
	PLA-PEG copolymer	Rat	Long bone
	Collagen	Dog	Spinal bone
rhBMP-7	Collagen	Dog	Long bone
EGF	Agarose	Hamster	Angiogenesis
aFGF	PVA	Rat	Dermis
	PVA	Mouse	Angiogenesis
bFGF	Alginate	Mouse	Angiogenesis
	Alginate	Mouse	Angiogenesis
	Agarose-heparin	Mouse, pig	Angiogenesis
	Amylopectin	Mouse	Angiogenesis
	Gelatin	Mouse	Angiogenesis, dermis, adipogenesis
	Gelatin	Rabbit, monkey	Skull bone
	Gelatin	Dog	Nerve
	Fibrin gel	Mouse	Angiogenesis
	Collagen minipellet	Rabbit	Long bone
	Collagen	Mouse	Cartilage
NGF	Poly(ethylene-co-vinyl acetate)	Rat	Nerve
	Collagen minipellet	Rabbit	Nerve
	PLGA	Rat	Nerve
TGF- β_1	PEG	Rat	Dermis
	Gelatin	Rabbit	Skull bone
	Plaster of Paris, PLGA	Rat	Skull bone
	TCP	Dog	Long bone
	Porous HA	Dog	Long bone
	Collagen	Baboon	Skull bone
	Collagen	Mouse	Dermis
	Porous HA	Rabbit	Long bone
	Collagen	Rat	Dermis
	Chitosan	Rat	Periodontal bone
PDGF-BB	Collagen	Mouse	Angiogenesis
	Alginate	Mouse, rat	Angiogenesis
	Gelatin	Mouse	Angiogenesis
HGF	PLGA-PEG	Rat	Adipogenesis
IGF-I	PLGA-PEG	Rat	Adipogenesis
VEGF/PDGF-BB	PLGA-alginate	Mouse	Angiogenesis
PDGF/IGF-I	Titanium implant	Dog	Jaw bone

Tab. 2: Studi sperimentali sul rilascio di fattori di crescita da carrier polimerici [87].

Tutti i lavori riportati in letteratura confermano la necessità di incapsulare i fattori di crescita in carrier per indurre la rigenerazione tessutale *in vivo*.

Uno dei problemi maggiori nella tecnologia di rilascio di proteine è la perdita dell'attività biologica della proteina rilasciata dalla formulazione proteina-carrier. E' stato dimostrato che la perdita di tale attività è principalmente dovuta alla denaturazione e deattivazione della proteina durante la preparazione della formulazione. Per questo motivo, è necessario sviluppare un metodo preparativo per il sistema di rilascio che minimizzi la denaturazione della proteina. Da questo punto di vista, i polimeri idrogeli possono essere considerati i candidati preferiti come carrier di proteine grazie alla loro biocompatibilità e capacità di assorbire soluzioni acquose contenenti le proteine da incapsulare [88].

In Fig. 10 è mostrato il concetto di base del rilascio controllato di fattori di crescita da un idrogelo biodegradabile.

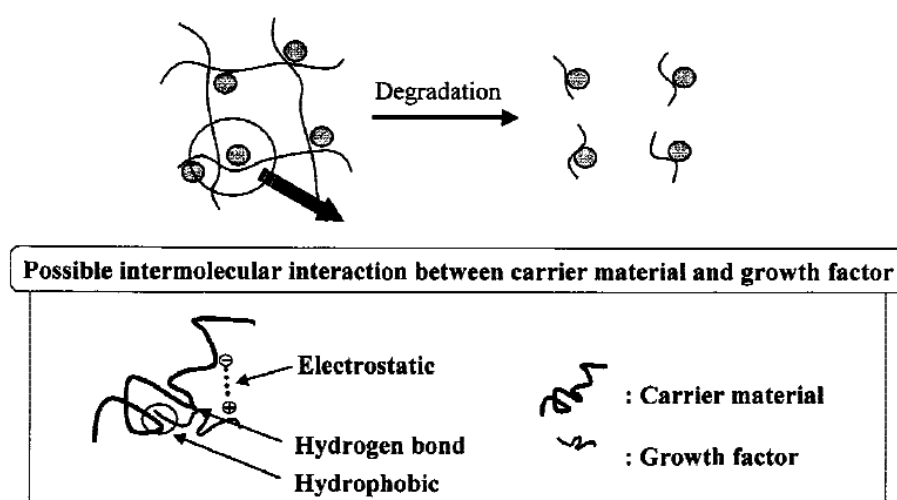


Fig. 10: Illustrazione grafica del principio di base del rilascio di fattori di crescita da polimeri idrogeli, basato sulle forze fisiche di interazione [88]

Prendiamo come esempio un idrogelo preparato con un polimero biodegradabile con carica negativa. Un fattore di crescita con carica positiva potrà, quindi, interagire elettrostaticamente con la catena polimerica, secondo una reazione di complessazione polianionica, permettendo al fattore di essere immobilizzato fisicamente all'interno dei carrier. Se avviene un cambiamento dell'ambiente, come ad esempio un aumento della forza ionica, il fattore di crescita immobilizzato sarà rilasciato dalla formulazione fattore-carrier. Anche se tale cambiamento dell'ambiente non ha luogo, la degradazione *in vivo* del carrier permetterà al fattore di crescita immobilizzato al suo interno di

solubilizzarsi in acqua, determinandone il rilascio. Dato che quest'ultimo caso di rilascio è il più probabile, è preferibile che il carrier utilizzato sia realizzato con polimeri biodegradabili. L'interazione con il carrier polimerico permette, inoltre, la protezione del fattore di crescita dalla denaturazione e dalla degradazione enzimatica *in vivo*.

La gelatina è stata selezionata come materiale idoneo per il rilascio di fattori di crescita in quanto è commercialmente disponibile con diverse proprietà chimico-fisiche ed è stata ampiamente utilizzata per scopi industriali, farmaceutici e medici. La biocompatibilità della gelatina è stata provata dal suo lungo utilizzo clinico. Un altro vantaggio unico di questo biomateriale è la sua natura elettrica, che dipende dal metodo di sintesi della gelatina. Sottoponendo, ad esempio, il collagene ad un processo alcalino si ha l'idrolisi del gruppo ammidico dell'asparagine e della glutammine residua, che fa aumentare il contenuto dei gruppi carbossilici; questo processo rende la gelatina acida carica negativamente. Se deve essere rilasciato un fattore di crescita con cariche positive presenti sulla sua superficie, allora la gelatina di tipo acido, carica negativamente, è da preferire come materiale per il carrier. E' stato dimostrato, ad esempio, che il fattore di crescita di base dei fibroblasti (bFGF) ed il fattore di crescita trasformante (TGF)- β 1 vengono assorbiti dalla gelatina acida come risultato dell'interazione elettrostatica [89]. Esperimenti su animali hanno rilevato che idrogeli di gelatina acida sono degradati nel corpo umano [90] ed il periodo di degradazione dipende dal loro contenuto di acqua, che viene misurato dal grado di cross-linking dell'idrogelo; maggiore è il contenuto di acqua e più velocemente sarà la degradazione *in vivo*. Ad esempio, le molecole di bFGF immobilizzate nell'idrogelo non possono essere rilasciate fino a quando quest'ultimo non degrada per generare frammenti di gelatina nel corpo umano. Il bFGF verrà quindi rilasciato dall'idrogelo insieme con i frammenti di gelatina nel corpo umano in seguito alla degradazione dell'idrogelo. Questi risultati dimostrano, quindi, che il rilascio di fattori di crescita è governato principalmente dalla degradazione dell'idrogelo.

E' stato osservato che il rilascio di bFGF da idrogeli in gelatina è in grado di stimolare l'angiogenesi, e sono state studiate diverse applicazioni terapeutiche utilizzando questa tecnologia [91-93]

Sakakibara *et al.* [94] hanno investigato l'utilizzo di microsfele in gelatina caricate con bFGF per indurre la crescita coronarica laterale, una nuova tecnica che mostra grandi

promesse per i pazienti che non sono candidati per una procedura di rivascularizzazione standard come l'angioplastica coronarica o un'operazione chirurgica di bypass delle coronarie. E' stato provocato un arresto cardiaco indotto da infarto miocardico in ratti e maiali. Nel modello dei ratti, 4 settimane dopo l'infarto, sono state iniettate nel miocardio microsfere caricate con ^{125}I -bFGF e utilizzando una soluzione di ^{125}I -bFGF come controllo. Nel modello dei maiali, è stato, invece, esaminata l'iniezione di microparticelle caricate con bFGF nella parete ventricolare sinistra utilizzando come controllo l'iniezione di particelle non cariche. I risultati dello studio sui ratti, hanno mostrato che, 72 h dopo l'iniezione, nel cuore dei ratti era presente una maggiore quantità di bFGF rispetto al controllo. Nel caso invece dei maiali, si è osservato un miglioramento della funzione ventricolare sinistra in seguito all'iniezione delle microsfere con bFGF rispetto al controllo.

Hosaka *et al.* [91] hanno utilizzato un sistema simile per realizzare un rilascio specifico intra-arteria di bFGF per migliorare la funzione collaterale dei vasi sanguigni in un modello animale di conigli. L'obiettivo di tale terapia è di ristorare in maniera efficiente l'apporto di sangue al tessuto ischemico inducendo la formazione di vasi sanguigni collaterali da un'arteria posizionata vicino al tessuto ischemico. In questo modo, è stata indotta nei conigli arteriogenesi e, quindi, la formazione di arterie ad ampia conduttanza nel tessuto ischemico.

E' stato inoltre dimostrato che l'ormone della crescita (GH) e il suo effettore tissutale, fattore di crescita insulino simile (IGF-1), possano indurre effetti benefici nella terapia dello scompenso cardiaco [95]. In particolare, studi su animali hanno mostrato un miglioramento del profilo emodinamico dopo somministrazione del GH e dell' IGF-1 nell'insufficienza cardiaca dovuta ad infarto del miocardio, con conseguente riduzione dell'apoptosi e aumento della sopravvivenza [96]. Tuttavia la limitazione nel successo dell'utilizzo dell' IGF-1 e di altri fattori di crescita nell'infarto del miocardio, è che la loro somministrazione sistemica determina significativi effetti collaterali secondari alla presenza di recettori distribuiti in numerosi tessuti dell'organismo. Per quanto concerne l'IGF-1 tali effetti includono: ipoglicemia, vasodilatazione, tachicardia riflessa e, nei casi più gravi, neoplasie.

Pertanto è fondamentale che la ricerca sperimentale nell'ambito delle applicazioni della rigenerazione del miocardio si focalizzi sullo studio di sistemi di rilascio intramiocardici

che consentano un rilascio controllato e diretto di fattori di crescita direttamente nel sito d'azione [97].

I primi studi presenti in letteratura che seguono questa linea di azione sono riportati di seguito.

Iwakura *et al.* [98] hanno rilasciato fattori di crescita di base per fibroblasti mediante microsfere in gelatina iniettabili ed hanno riportato un aumento dell'angiogenesi ed un miglioramento della funzione cardiaca.

Christman *et al.* [99] hanno osservato una neovascolarizzazione nel miocardio ischemico in seguito all'iniezione di colla di fibrina per il rilascio di un plasmide codificato con il fattore di crescita angiogenico, pleiotrophin.

Infine, Hsieh *et al.* [100] hanno utilizzato peptidi *self-assembling* come sistema di rilascio del fattore di crescita BB da piastrina. Hanno osservato che il rilascio controllato di tale fattore di crescita per 14 giorni nel miocardio infartuato, ha determinato una diminuzione della morte dei cardiomiociti e un miglioramento della funzione cardiaca rispetto all'iniezione di peptidi o fattori di crescita da soli. Hanno inoltre dimostrato una riduzione della dimensione dell'infarto.

Dai primi risultati ottenuti risulta evidente l'importanza dell'utilizzo di sistemi di rilascio controllato al fine di preservare l'attività dei fattori di crescita e prolungare la loro funzione biologica *in vivo*.

Capitolo 2

Analisi sperimentale: Strumenti e metodi

2.1 Materiali utilizzati

Gelatina

La gelatina è una proteina ottenuta mediante denaturazione termica o degradazione chimica o fisica del collagene. Questo processo determina la rottura della struttura a tripla elica del collagene con conseguente ottenimento di una sostanza con conformazione casuale, *random coil*, tipica della gelatina.

La gelatina è fabbricata attraverso un complesso processo in più stadi, rappresentato in figura 1.

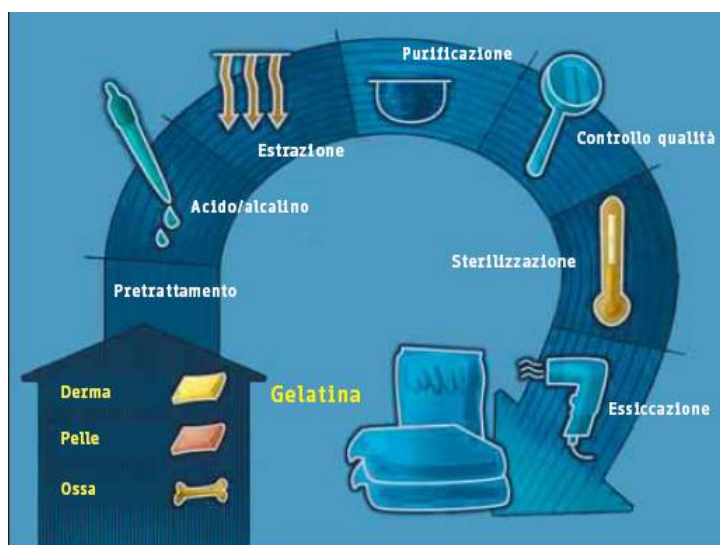


Fig.1 : Schematizzazione del processo di fabbricazione della gelatina

Il materiale di partenza è il tessuto connettivo di maiali, bovini, pollame o pesce. Le proteine collagene contenute nella pelle e nelle ossa dei maiali e dei bovini vengono trasformate in gelatina. Le materie prime vengono dapprima sgrassate e demineralizzate. Successivamente si adottano due diversi metodi di pretrattamento che

variano in funzione della materia prima e dello scopo d'impiego della gelatina: procedimento alcalino e procedimento acido. Dopo il lavaggio la gelatina può essere estratta sciogliendola con acqua calda e separandola dalla restante materia prima. A questo punto le soluzioni estratte vengono purificate dalle tracce di grasso e dalle fibre fini in separatori ad alto rendimento. Appositi filtri eliminano anche le impurità più infime. Nell'ambito di un ultimo passo di depurazione la gelatina è depurata anche dal calcio, dal sodio nonché da residui acidi e da altri sali. A questo punto la soluzione di gelatina viene concentrata in impianti di evaporazione sottovuoto e resa spessa formando una massa simile al miele che viene macinata in granelli. Vasti controlli qualitativi nell'arco dell'intero processo di fabbricazione assicurano la qualità e la purezza della gelatina.

A seconda del tipo di pretrattamento effettuato sulle materie prime si possono ottenere due differenti tipologie di gelatina (Fig.2):

1. **Type B** si ottiene mediante la denaturazione termica del collagene presente nel tessuto connettivo dei bovini. Essendo quest'ultimo fortemente reticolato è necessario pretrattarlo per diverse settimane con soluzioni alcaline che causano l'idrolisi dei gruppi ammidici del collagene. La gelatina ottenuta in questo modo presenta un'elevata densità di gruppi carbossilici e, quindi, sarà caricata negativamente. Questo comporta una riduzione del suo punto isoelettrico (IEP) a circa 5, per cui si tratta di gelatina acida [89];
2. **Type A**: si ottiene mediante denaturazione termica del collagene presente nel tessuto connettivo della cotenna di maiale. In questo caso è applicato un trattamento di un giorno a base di acidi con successiva neutralizzazione e lavaggio intenso dei sali, prima che la gelatina possa essere estratta sciogliendola con acqua calda. La natura elettrostatica del collagene difficilmente può essere modificata da un trattamento acido a causa di una reazione meno invasiva dei suoi gruppi ammidici. Per questo motivo, il punto isoelettrico della gelatina di tipo A rimane simile a quello del collagene che è circa 9 [89].

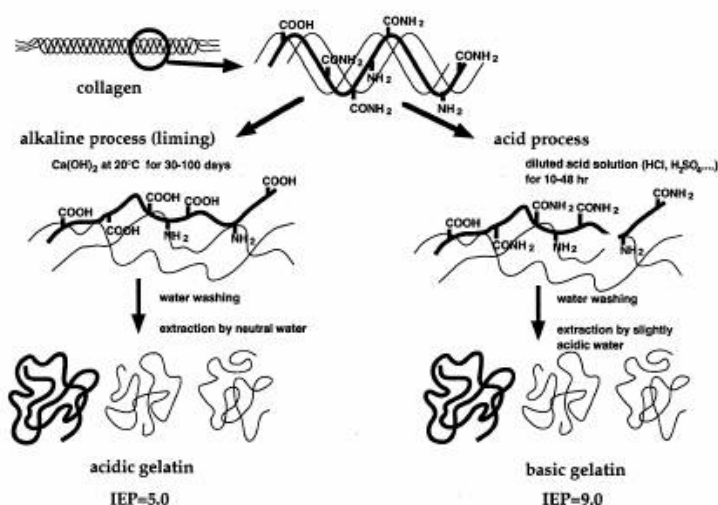


Fig. 2 :Schematizzazione pretrattamenti acidi e basici del collagene [89].

PROPRIETA' CHIMICHE

Per quanto riguarda la struttura chimica della gelatina, essendo una proteina, essa contiene 18 differenti amminoacidi (AA) uniti insieme in sequenza in modo da formare catene polipeptidiche di circa 1000 AA per catena, nota come struttura primaria (Tab. 1). Le sequenze di amminoacidi più frequenti sono: $-(\text{Gly-X-Pro})_n$ - e $-(\text{Gly-X-Hypro})_n$. L'amminoacido glicina è presente nell'elevatissima concentrazione di 20,6 g per ogni 100 g di gelatina, seguito dalla prolina con 11,7 g. Questi due amminoacidi sono i componenti più importanti del tessuto connettivo, poiché gli conferiscono la sua solidità ed elasticità. Il terzo amminoacido di notevole importanza presente nella gelatina è la lisina (3,4 g per ogni 100 g di gelatina), necessaria al mantenimento e alla formazione di nuovo tessuto nonché alla crescita delle cellule e delle ossa.

Aminoacidi (g) per ogni 100 g di gelatina pura	
Alanina	11,3
Arginina*	9,0
Acido aspartico	6,7
Acido glutammico	11,6
Glicina	27,2
Istidina*	0,7
Prolina	15,2
Idrossiprolina	13,3
Idrossilisina	0,8
Isoleucina*	1,6
Leucina*	3,5
Lisina*	4,4
Metionina*	0,6
Fenilalanina*	2,5
Serina	3,7
Treonina*	2,4
Triptofano*	0,0
Tirosina	0,2
Valina*	2,8

*Aminoacidi essenziali

Tab. 1 :Aminoacidi presenti nella gelatina

Gli amminoacidi sono uniti tra loro tramite legami peptidici, ossia legami covalenti tra l'atomo di carbonio del gruppo carbossilico (COOH) di un AA e l'atomo di azoto del gruppo amminico (NH_2) di un altro AA, come si vede in Figura 3:

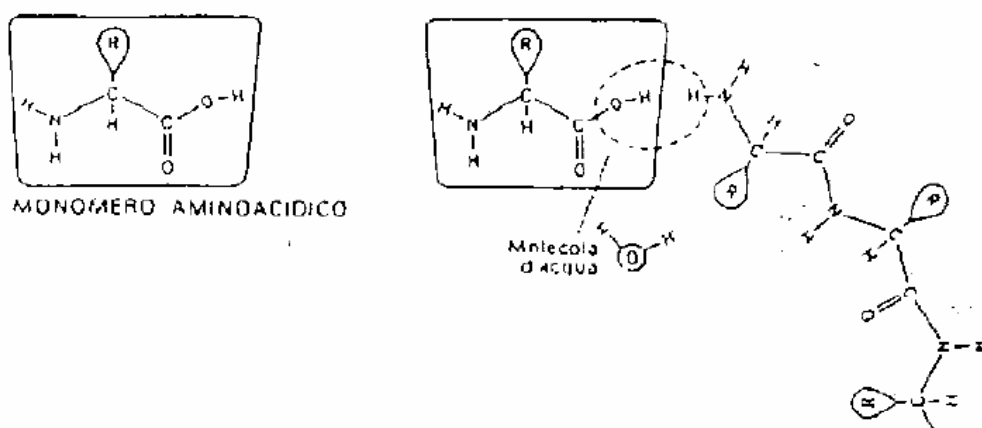


Fig. 3: Formazione di peptidi

Gli amminoacidi hanno la caratteristica di avere nella loro struttura contemporaneamente gruppi basici, NH_2 , e acidi, COOH , legati ad un atomo di

carbonio α di una catena idrocarburica lineare, ciclica o aromatica detta catena laterale. A volte la catena laterale può contenere funzioni ossidriliche OH – o può portare su uno dei suoi atomi di carbonio un altro gruppo NH_2 – o $COOH$ – ed in tal caso gli amminoacidi si dicono polari.

Un generico amminoacido può essere schematizzato come in figura 4, dove:

- **R** indica la catena laterale;
- **C** indica l'atomo di carbonio in α , adiacente al gruppo carbossilico.

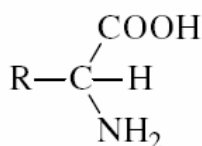


Fig. 4 : Struttura di un amminoacido

Al variare della natura di **R** si possono ottenere tutti gli amminoacidi naturali e sintetici conosciuti. In generale una proteina contiene venti diversi tipi di amminoacidi, cioè venti tipi di catene laterali fra loro differenti per dimensione, carica, capacità di formare legami e reattività chimica.

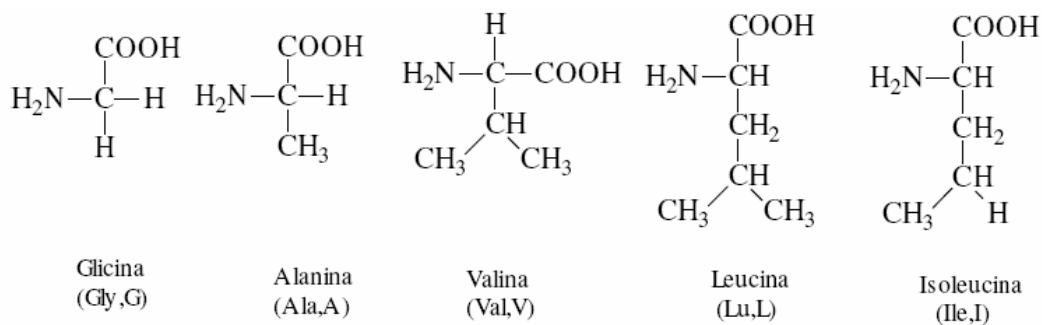


Fig.5 : Amminoacidi con catene laterali alifatiche

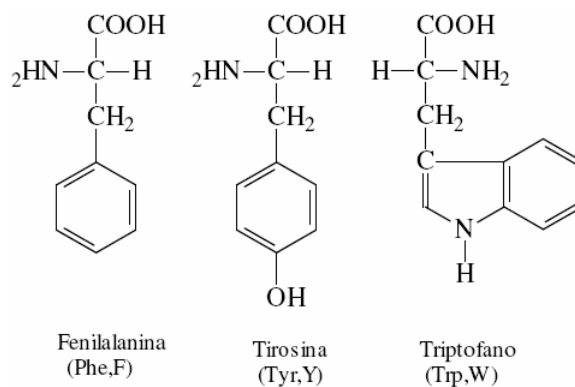


Fig. 6: Amminoacidi con catene laterali aromatiche

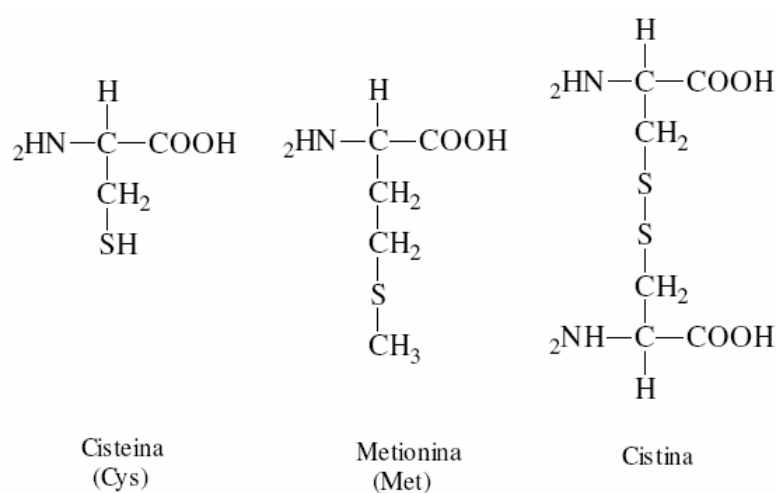


Fig. 7: Amminoacidi solforati

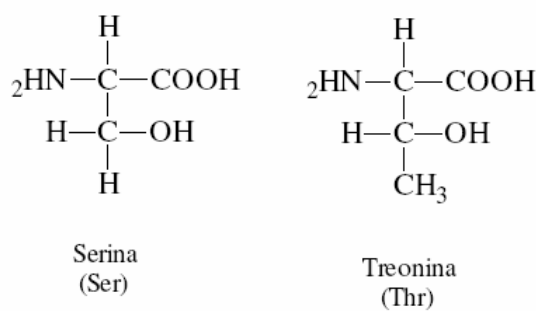
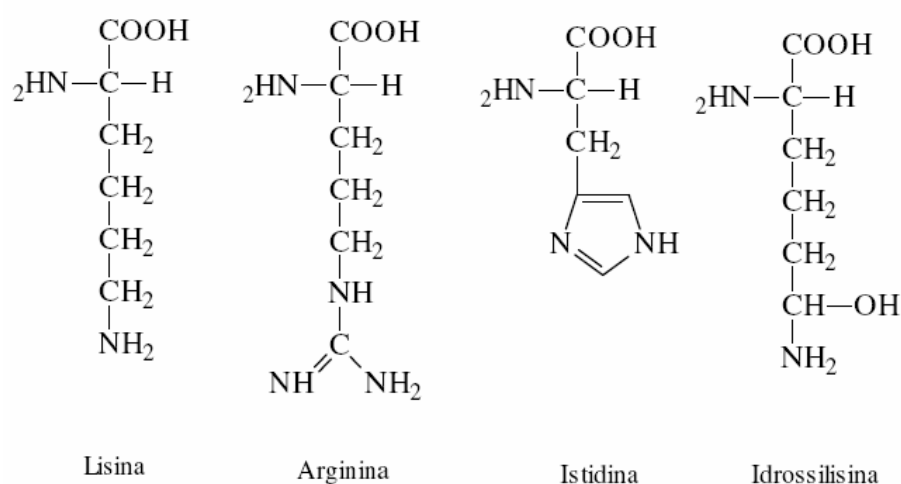
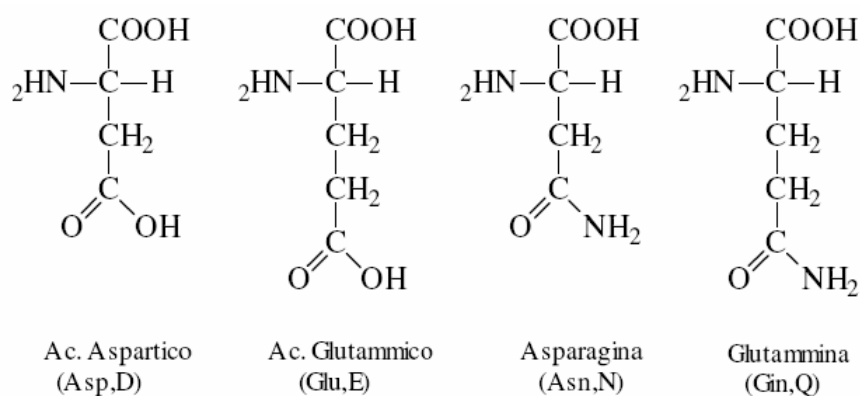


Fig. 8: Amminoacidi con catene laterali ossidrilate


Fig. 9: Amminoacidi a carattere basico

Fig. 10: Amminoacidi con catene laterali acide e loro ammidi

In ogni caso, indipendentemente dalle catene laterali, gli amminoacidi in soluzione a pH neutro sono ioni bipolari, o zwitterioni, perchè le funzioni amminiche sono protonate (NH_3^+) ed i gruppi carbossilici sono dissociati COO^- come indicato in Fig.11:

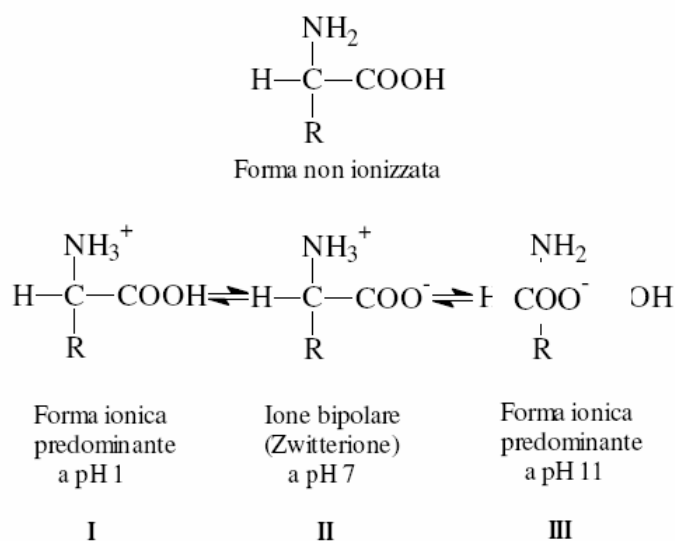


Fig. 11: Struttura non ionizzata e strutture ionizzate di un amminoacido

Lo stato di ionizzazione dipende dal pH del mezzo per cui, in una soluzione molto acida, il gruppo carbossilico non avrà la possibilità di dissociarsi mentre la funzione amminica sarà protonata; viceversa in soluzione alcalina. La qualità e la sequenza degli amminoacidi in una data catena determinano in maniera univoca la conformazione della proteina e la funzione biologica della stessa. La coesione del reticolo collagenico è dovuta all'unione delle diverse catene peptidiche tramite legami non covalenti che possono essere di tipo ionico o a ponte d'idrogeno, oltre alle più deboli interazioni di Van der Waals. I legami ionici derivano dall'accostamento di ioni di carica opposta delle catene laterali:

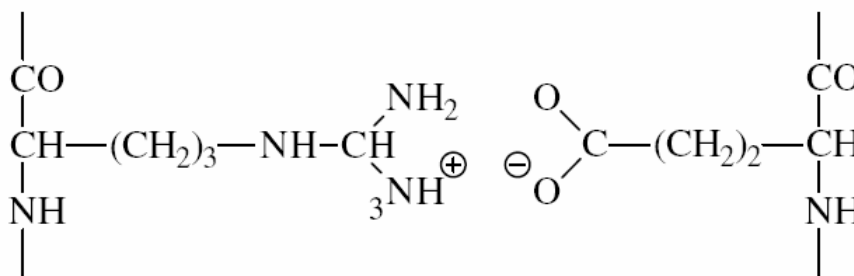


Fig. 12: Esempio di legame ionico o salino

I legami a idrogeno, che si formano tra un donatore ed un accettore di protoni, rappresentano l'agente di ponteggio più comune delle proteine e possono formarsi sia tra catene polipeptidiche vicine che tra gruppi terminali di catene laterali.

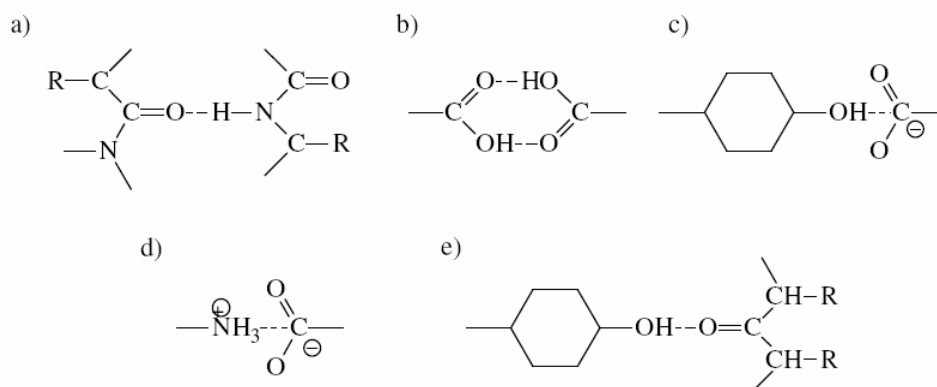


Fig. 13: Esempi di legame a idrogeno

Una caratteristica fondamentale del collagene è il suo “punto isoelettrico” o *P.I.* che coincide con quel valore di *pH* del mezzo, al quale le cariche positive e negative della proteina si bilanciano tra loro; in altre parole, la proteina è in uno stato di grande inerzia reattiva. In ragione del suo carattere anfotero, se immesso in ambiente acido, le cariche negative dei gruppi carbossilici delle catene laterali del collagene vengono neutralizzate dai protoni del mezzo, venendosi a verificare uno sbilanciamento delle cariche a favore di quelle positive come si può vedere nell'equazione di Fig.14.

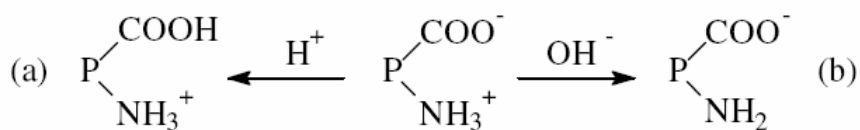


Fig. 14: Carattere anfotero del collagene

Viceversa, in ambiente alcalino, le cariche positive delle catene laterali migrano nel mezzo con conseguente sbilanciamento a favore delle cariche negative, con generazione di un complesso caricato negativamente. Si può quindi individuare (tramite tecniche elettroforetiche) un valore del *pH* al quale non si osserva più alcuna migrazione delle cariche, valore corrispondente appunto al punto isoelettrico della proteina, che per il

collagene è circa 7.5. In bagni caratterizzati da pH al di sopra di questo valore, la proteina sarà caricata negativamente, mentre al di sotto di 7.5 sarà caricata positivamente.

Al valore del $P.I.$, il collagene è caratterizzato da una grande inerzia chimico-fisica caratterizzata da:

- minima tendenza a reagire;
- minima viscosità;
- minimo gonfiamento.

CROSSLINKING:

Una delle principali caratteristiche della gelatina è la sua biocompatibilità e la formazione di prodotti di degradazione non tossici e rapidamente metabolizzati. Poiché tale proteina è idrosolubile, per essere utilizzata in applicazioni biomediche deve essere modificata chimicamente mediante reazioni di crosslinking in modo da ottenere un materiale insolubile in ambiente acquoso a 37°C.

Diversi metodi vengono utilizzati per crosslinkare i materiali collaginei. Una prima classificazione possibile riguarda la distinzione tra l'utilizzo di agenti chimici e trattamenti fisici.

Nell'ambito degli agenti crosslinkanti chimici è possibile effettuare una suddivisione in due gruppi:

- formaldeide, glutaraldeide, gliceraldeide, composti epossidici, genipina etc. i quali fanno da ponte tra i gruppi amminici della lisina, idrossilisina o arginina di differenti catene polipeptidiche mediante crosslink monometrici o oligomerici;
- crosslink di tipo amidico possono essere realizzati mediante l'attivazione dei gruppi carbossilici di acido glutammico o aspartico, da parte di agenti chimici quali ad esempio la carbodiimide o la transglutaminase, seguita dalla reazione di tali gruppi carbossilici attivati con i gruppi amminici di un'altra catena polipeptidica.

Per quanto riguarda i trattamenti di crosslinking fisico, quali ad esempio trattamenti termici, irradiazione a microonde, raggi γ o ultravioletti, essi consistono nell'attivare

una reazione di condensazione tra i gruppi carbossilici e quelli amminici presenti su catene adiacenti della proteina mediante la rimozione dell'acqua di struttura.

In particolare in questo lavoro di tesi sono stati utilizzati i seguenti agenti chimici crosslinkanti:

- Glutaraldeide il cui utilizzo in applicazioni biomediche è ristretto a causa della presenza di prodotti di degradazione e residui della reazione di crosslinking tossici, utilizzato solo per crosslinkare i campioni per test non biologici;
- Gliceraldeide la quale può essere considerata una molecola naturale in quanto è presente nel corpo umano come prodotto metabolico del fruttosio;
- La Transglutaminase il quale è un enzima non tossico che determina la formazione di un legame covalente tra i gruppi amminici e carbossilici liberi della gelatina.

2.2. Preparazione delle microsfere

In questo lavoro si è proceduto alla realizzazione di microsfere in gelatina Tipo B (*Sigma Aldrich Chemical Company, Bloom 225, $M_w=176654$ Dalton*). Per la realizzazione di tali particelle sono state utilizzate due metodologie: singola emulsione (W/O) e doppia emulsione (O/W/O).

2.2.1 Singola emulsione

Uno dei metodi più comuni per la realizzazione di microsfere in gelatina consiste nell'emulsione water-in-oil (W/O) in cui una fase acquosa contenente la gelatina viene dispersa in una fase oleosa continua.

Nel caso specifico l'olio utilizzato è il Cottonseed Oil (*Aldrich Chemical Company*). La fase acquosa consiste in una soluzione di 20 ml di acqua bidistillata con una concentrazione del 30% in peso di gelatina.

La procedura seguita consiste nelle seguenti fasi:

1. Preparazione della soluzione acquosa in cui la gelatina viene disciolta in acqua mediante agitazione magnetica alla temperatura di 60°C, in modo da consentirne il completo scioglimento.

2. La fase oil è stata preriscaldata opportunamente alla temperatura di 60°C.
3. La fase acquosa viene aggiunta goccia a goccia alla fase oil ed il sistema viene miscelato per 30 minuti alla temperatura di 60°C e con un'opportuna velocità, mediante un agitatore meccanico o magnetico (*FALC Instruments mod. AT, PW: 85 W*), al fine di ottenere delle microparticelle disperse (Fig. 15).

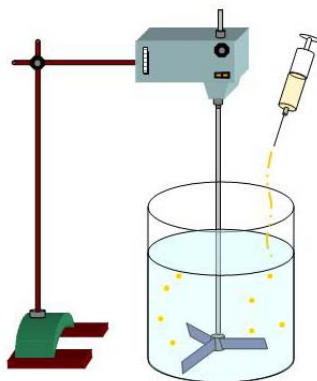


Fig. 15: Miscelazione meccanica di W/O a T=60°C

4. Una volta ottenuta l'emulsione, il sistema viene rapidamente raffreddato mediante immersione in un bagno di ghiaccio fino alla temperatura di circa 5°C, in modo da solidificare le microsfele della fase dispersa.
5. La fase successiva consiste nel deidratare le microsfele mediante l'aggiunta di 60 ml di acetone preraffreddato a 5°C.
6. Le microsfele così ottenute vengono filtrate e lavate con acetone preraffreddato a 5°C in modo da eliminare la fase oil.
7. Le microsfele di gelatina ottenute vengono crosslinkate con differenti concentrazioni di agente crosslinkante mediante agitazione magnetica a 800 rpm a 5°C per 24 h.
8. Infine, le microsfele crosslinkate vengono filtrate e lavate con acetone preraffreddato a 5°C.

Diverse tipologie di microsfele sono state realizzate variando singolarmente tre parametri al fine di controllare le dimensioni delle particelle e l'efficienza del crosslinking:

- ✓ Velocità di agitazione

- ✓ Agente crosslinkante
- ✓ Concentrazione agente crosslinkante

Le tipologie di campioni realizzati sono riportati nella seguente tabella:

Tipo	Velocità di agitazione meccanica (rpm)	Velocità di agitazione magnetica (rpm)	Agente crosslinkante	Concentrazione agente crosslinkante (%)
G ₁	800	/	GAL	10
G ₂	800	/	GAL	20
G ₃	800	/	GLU	20
G ₄	400	/	GLU	20
G ₅	200	/	GLU	20
G ₆	800	/	TGase	0, 5
G ₇	800	/	TGase	10
G ₈	800	/	TGase	20
G ₉	/	800	GLU	20
G ₁₀	/	200	GLU	20

Tab. 2:Tipologie di campioni realizzati

2.2.2 Doppia emulsione

L'emulsione multipla O/W/O consiste in un sistema trifase in cui le goccioline di fase acquosa, contenenti una fase oleosa interna, vengono disperse in una fase oleosa esterna. Nel caso specifico, il metodo di preparazione consiste in una singola emulsione effettuata come se fosse una doppia emulsione. Inizialmente la fase oil costituita da 10 ml di toluene (*Sigma Aldrich Chemical Company, 99%*) con un'opportuna percentuale di surfattante, SPAN 85 (*Sigma Aldrich Chemical Company*), viene dispersa sotto forma di goccioline mediante agitazione magnetica nella fase acquosa contenente gelatina al 8% (w/v) e surfattante TWEEN 85 (*Sigma Aldrich Chemical Company*) al 6% (w/v). All'aumentare della quantità di oil aggiunto, fino ad un volume finale di 40 ml, la fase acquosa diventerà la fase dispersa e quella oil la fase disperdente. In questo modo si

formano microsfere di gelatina contenenti al loro interno goccioline di oil. L'emulsione e le fasi successive verranno condotte come spiegato nel paragrafo 3.2.1; in particolare, la rimozione della fase oil con acetone determina la formazione di pori sulla superficie delle microsfere di gelatina e internamente.

2.3 Incapsulamento di IGF-1 nelle microsfere lisce

Il fattore di crescita tipo-insulina (IGF-1) è un polipeptide ampiamente diffuso che regola le risposte cellulari pleiotropiche tra cui la crescita ipertrofica, la proliferazione, la protezione da apoptosi e la differenziazione in vari tessuti [101-103]. In particolare, l'IGF-1 promuove la crescita miocardica [104], ed inibisce l'apoptosi dei cardiomiociti [105, 106].

A tale scopo, le microsfere in gelatina lisce sono state caricate con il fattore di crescita IGF-1 ed iniettate nel miocardio in seguito ad infarto acuto.

Le microsfere in gelatina sono state preventivamente setacciate con setacciatore (*ASTM IG/3-EXP SAREL*) al fine di isolare il seguente range dimensionale: 35÷50 µm. In seguito, 2 mg di microsfere vengono sterilizzate in autoclave per 20 min a 120°C. L'incapsulamento dell'IGF-1 al loro interno avviene mediante assorbimento di una soluzione acquosa di IGF-1 da parte delle microsfere, grazie alle proprietà di swelling della gelatina [107]. Nello specifico, 2 mg di microsfere sono state immerse in una soluzione (20 µl) contenente IGF-1 (10 mg/ml) per 48 h. Il volume scelto di soluzione di IGF-1 è inferiore al volume teorico di equilibrio di swelling delle microsfere in modo da assicurare il completo assorbimento del fattore di crescita all'interno delle microsfere. In seguito, le microsfere vengono sciacquate, filtrate e liofilizzate per poi essere sospese in soluzione fisiologica (100 µl) a concentrazione di 2 mg/ml per studiarne il rilascio a diversi intervalli di tempo, mediante l'utilizzo di un KIT ELISA specifico per la lettura in assorbenza allo spettrofotometro del fattore di crescita IGF-1. Per ogni tipologia di campione sono state preparati 3 batches per le misure del rilascio *in vitro*.

2.4 Semina delle cellule mesenchimali umani del midollo osseo nelle spinner flask

Le microsfere porose in gelatina vengono idratate in soluzione salina (PBS) (*OXOID ph 7,3*) per un'ora. In seguito i microcarrier vengono autoclavati a 121°C per 15 min e pre-incubati nel mezzo di coltura delle cellule a 4°C overnight.

La fase di semina avviene attraverso l'utilizzo di un sistema di coltura in sospensione in Spinner Flask (Bellco) da 100 ml. Ogni spinner flask viene inoculata con una densità cellulare di 100.000 cell/ml e 0.5 mg/ml di biglie in 100 ml di mezzo. Per permettere un'adeguata e uniforme distribuzione delle cellule sulle microbiglie nel sistema di coltura in sospensione è necessario stabilire un protocollo per la velocità di stirring e la semina delle cellule. E' stata utilizzata una velocità di stirring iniziale di 20 rpm per 3 min alternata a 30 min senza stirring per le prime 5 ore di coltura al termine delle quali lasciamo uno stirring continuo di 20 rpm, che dopo 24 h aumentiamo a 30 rpm. Per tutti gli esperimenti le cellule staminali mesenchimali del midollo osseo sono state utilizzate al sesto passaggio.

2.5 Animali e induzione della patologia

In questa prima fase sperimentale, i test *in vivo* sono stati condotti su ratti maschi Sprague-Dawley del peso di 180-200 g al momento dell'intervento, divisi in 2 gruppi:

1. 10 ratti sottoposti ad infarto del miocardio e trattati con microsfere vuote;
2. 10 ratti sottoposti ad infarto del miocardio e trattati con microsfere contenenti IGF-1.

I due gruppi sono stati sottoposti ad infarto del miocardio mediante legatura del ramo discendente anteriore dell'arteria coronarica sinistra [108]. Gli animali sono stati profondamente anestetizzati con un'iniezione intraperitoneale di Zoletil 100 seguita da un trattamento sottocutaneo di Atropina allo scopo di ridurre gli effetti dell'anestetico sulla secrezione salivare. Gli animali sono stati ventilati artificialmente con un ventilatore a pressione positiva per piccoli mammiferi (Harvard Rodent Ventilator).

Al raggiungimento dell'anestesia profonda, è stata eseguita una toracotomia anteriore, il cuore è stato esposto e privato del pericardio, l'arteria coronarica discendente anteriore sinistra è stata legata con un filo di seta 6.0 in prossimità dell'auricola sinistra.

Durante tutto l'intervento è stata monitorata la funzione miocardica con elettrocardiogramma ECG (Powerlab-modulo ECG-AD instrument), anche allo scopo di comprovare l'efficacia della legatura coronarica.

2.6 Inoculazione sfere nel miocardio

Circa dieci minuti dopo l'infarto, i ratti hanno ricevuto differenti iniezioni intramiocardiche di microsfele vuote di gelatina (2 mg/ml, gruppo 1) oppure caricate con IGF-1 (gelatina: 2 mg/ml, IGF-1: 10 mg/ml, gruppo 2). Per entrambi i gruppi, la soluzione isotonica di microsfele, è stata iniettata direttamente nella parete anteriore del ventricolo sinistro intorno alla zona infartuata e sono state eseguite 10 microiniezioni da 10 µl ognuna, in 10 siti diversi con un ago 27 Gauge.

Il corpo della siringa è stato mantenuto in continua leggera agitazione, per impedire alle microsfele di sedimentare al suo interno.

Ogni iniezione è stata eseguita inserendo l'ago della siringa nella parete ventricolare, in posizione inclinata per favorire un rilascio graduale delle microsfele. L'estrazione dell'ago è avvenuta dopo aver atteso all'incirca 10 secondi in modo da permettere al liquido di essere riassorbito dal tessuto.

Al termine delle microiniezioni, il cuore è stato riportato nella sua normale posizione ed eventualmente trattato con Xilocaina (Fig. 16). Avendo cura di ridurre lo pneumotorace, l'animale è stato aiutato a recuperare la sua forma nel periodo post operatorio sotto il controllo del veterinario responsabile.

Sono state contate, inoltre, le microsfele residue in tutte le siringhe utilizzate in modo da avere una stima di quante sfere effettivamente sono penetrate nel miocardio, considerando che la soluzione totale di partenza era di 100 µl. Tale conteggio è stato eseguito mediante visualizzazione al microscopio per mezzo di un obiettivo 5X. Nello specifico, le siringhe sono state svuotate per mezzo di un lavaggio in tampone, la soluzione così ottenuta è stata esaminata su pozzetti grigliati. Le sfere sono state contate con l'ausilio di un counter manuale.

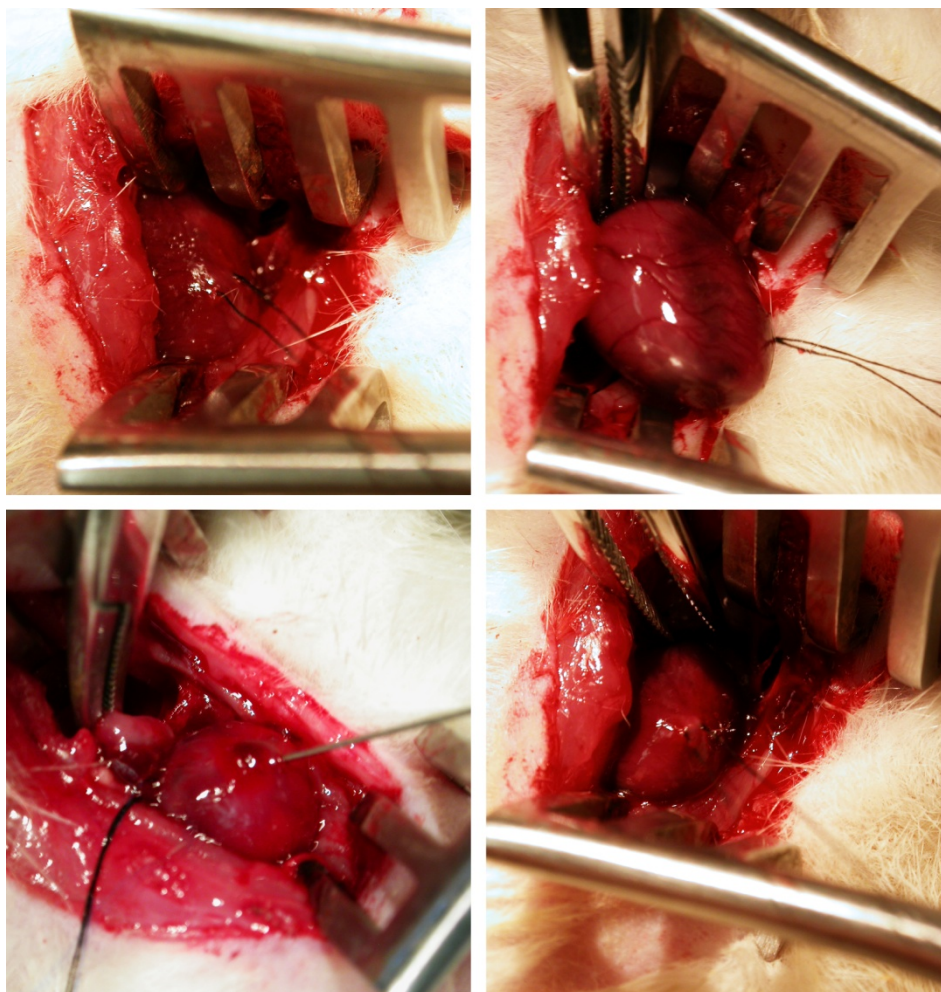


Fig. 16 Inoculazione delle microsfe: In **A** è rappresentata una toracotomia anteriore e l'esposizione del miocardio; in **B** è raffigurato il passaggio del filo di sutura 6.0 all'apice del ventricolo sinistro. In **C** e **D** sono mostrate, rispettivamente, l'iniezione intramiocardica della soluzione contenente le microsfe e il riposizionamento del miocardio nella cavità toracica.

2.7. Analisi dei campioni

2.7.1 Analisi morfologica

L'analisi della microstruttura è stata eseguita mediante microscopio a scansione elettronica (SEM) grazie al quale risulta possibile valutare la morfologia delle varie tipologie di campioni.

Preventivamente ciascun campione è stato sottoposto ad un processo di metallizzazione indispensabile affinché possa essere acquisita un'immagine ottimale.

Principio di funzionamento del Microscopio a Scansione Elettronica (SEM):

Il microscopio a scansione elettronica è un dispositivo che, sfruttando l'interazione degli elettroni con la materia, è in grado di acquisire l'immagine della superficie di un campione ingrandendola fino a milioni di volte.

L'architettura dello strumento prevede la presenza di due parti essenziali:

- ✓ Un blocco cilindrico in cui sono contenuti vari elementi quali un filamento in tungsteno, sistemi di bobine e lenti condensatrici.
- ✓ Una base sulla quale è collocato il portacampioni in cui è presente il provino nonché una serie di sensori in grado di rilevare gli elettroni che sono deviati secondo diverse modalità.

Infine, lo strumento è corredato di un'unità di elaborazione che permette l'assegnazione delle informazioni necessarie all'esecuzione della prova e gli spostamenti lungo la superficie del campione. In particolare, esso è corredato di un monitor CRT sul quale viene visualizzata in tempo reale l'immagine scannerizzata dallo strumento.

Il principio di funzionamento di un SEM è caratterizzato da molteplici fasi.

All'interno del blocco cilindrico è presente un filamento in tungsteno il quale, sottoposto a riscaldamento, è in grado di emettere un fascio di elettroni; esso viene opportunamente accelerato a seguito di una differenza di potenziale applicata ai capi del filamento, che funge da catodo, orientando gli elettroni verso una piastra forata, che funge da anodo.

E' evidente che è possibile regolare la velocità di emissione degli elettroni al variare della tensione applicata (il suo valore può oscillare tra 1KeV e 50KeV). Il fascio di elettroni, prima di giungere al campione, è preventivamente "*messo a fuoco*" attraverso un sistema di lenti condensatrici e indirizzato per effetto di campi magnetici presenti all'interno di bobine (*scan coils*) percorse da correnti alimentate da un generatore (*scan generator*).

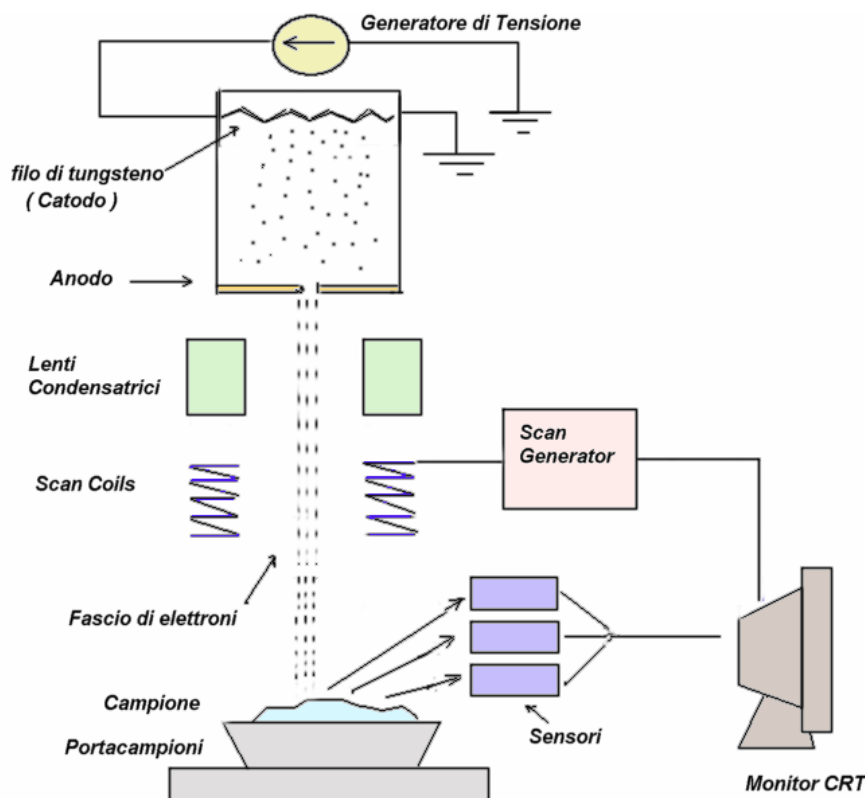


Fig.17: Schema dell'architettura di un microscopio a scansione elettronica SEM

Il fascio di elettroni giunge alla superficie del campione dove si verificano dei fenomeni di interazione tra elettroni e materia e le emissioni vengono rilevate da opportuni sensori, che trasferiscono i segnali, debitamente convertiti, ad un monitor CRT.

L'immagine rilevata è costituita da tanti "*spot*" luminosi la cui intensità è legata all'intensità delle emissioni; in particolare la presenza di zone più chiare è dovuta alle emissioni relative ad elementi di numero atomico più elevato e quindi in grado di emettere più elettroni, mentre le zone più scure sono riferite ad emissioni relative ad elementi con numero atomico più basso. Un parametro fondamentale nella valutazione di una micrografia SEM è l'**ingrandimento** definito come rapporto di scala tra la dimensione dell'elemento di superficie scansionata b e la dimensione L del corrispondente tratto visualizzato sul monitor:

E' evidente che, al crescere dell'ingrandimento, e pertanto al diminuire del tratto b del provino lungo cui avviene la scansione, aumentano le interazioni tra il fascio di elettroni ed il campione, in quanto gli elettroni interagiscono su porzioni di superficie sempre più ridotte, il che comporta una difficoltà crescente nella messa a fuoco dell'immagine.

2.7.2 Analisi dimensionale delle microsfere: Image J

Le misure delle dimensioni delle particelle è stata effettuata in triplicato mediante un software di analisi per immagini, ImageJ.

ImageJ è un software open source, programmato in Java, che nasce con l'obiettivo di emulare le funzionalità dei più comuni software commerciali per l'immagine processing.

ImageJ consente di visualizzare, modificare, analizzare, processare, salvare e stampare immagini a 8-bit, 16-bit e 32-bit.

ImageJ offre la possibilità di calcolare l'area e le statistiche sui valori dei pixel relativamente a delle regioni (ROI= Region Of Interest) selezionate dall'utente.

Le immagini acquisite mediante microscopio ottico vengono trasformate in immagini 8-bit. In seguito viene effettuato un threshold dell'immagine per ottenere un contrasto di colori in modo da poter calcolare l'area delle immagini selezionate e da questa il diametro delle microsfere (Fig. 18).

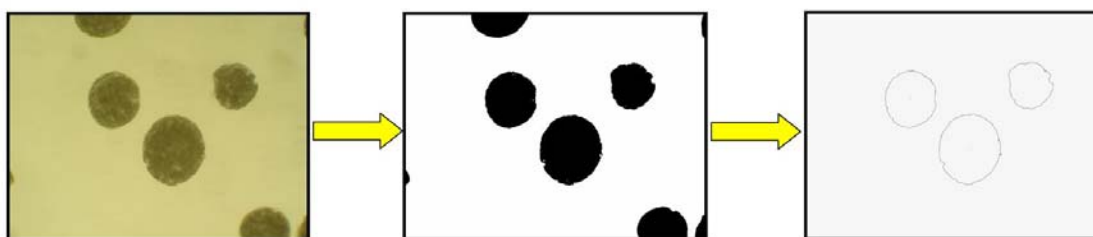


Fig.18: Processo di analisi delle microparticelle mediante programma ImageJ.

2.7.3 Analisi termica: DSC

Le misure calorimetriche sono state realizzate mediante Calorimetro a Scansione Differenziale (DSC) (TA Instrument mod. Q1000). I campioni sono stati esaminati sia in condizioni dry che wet. Le misure sui campioni wet sono state effettuate su quantità note di gelatina (3-4 mg per campione) conservati in una miscela di acqua ed etanolo in rapporto 2:3 per 72h (umidità relativa costante = 75 %). I campioni wet sono stati asciugati con carta filtro per rimuovere il liquido in eccesso e chiusi ermeticamente in una capsula in alluminio (per prevenire qualsiasi perdita di liquido durante le misure).

Il riscaldamento è stato condotto a 5°C/min in un range di temperatura variabile tra -5°C e 120°C. La temperatura di denaturazione (T_D) è stata determinata come il valore del picco del corrispondente fenomeno endotermico. Il valore dell'entalpia di denaturazione, H_D , è stata calcolata in relazione al peso della gelatina dry.

Principio di funzionamento del Calorimetro a Scansione Differenziale (DSC)

L'analisi termica a scansione differenziale, generalmente nota come DSC, è un utile strumento nell'analisi dei polimeri. La determinazione delle temperature di fusione e di transizione vetrosa, del calore specifico e lo studio della cinetica di cristallizzazione di materiali a matrice polimerica, sono le più comuni applicazioni di questa tecnica.

Essa si basa sulla rilevazione e registrazione in forma di termogramma dei fenomeni esotermici ed endotermici che avvengono nel provino posto nella cella del calorimetro durante i processi chimico-fisici indotti da variazioni della temperatura.

Ciò avviene misurando la differenza di calore assorbito o ceduto dal campione rispetto a quella di un materiale inerte di riferimento sottoposto allo stesso trattamento termico.

Il calorimetro a scansione differenziale consente di ottenere diagrammi in cui è riportato il calore scambiato (heat flow) in funzione della temperatura o del tempo (Fig. 19). Il segnale in ordinata, che rappresenta la velocità di assorbimento di calore, è proporzionale al calore specifico del campione (quantità di energia termica necessaria per ottenere un determinato aumento di temperatura).

Ogni transizione, accompagnata da un cambiamento nel calore specifico, produce una discontinuità nel segnale di alimentazione ed i cambiamenti esotermici o endotermici di entalpia determinano dei picchi, la cui area è proporzionale al cambiamento totale di entalpia e alla quantità di sostanza presente.

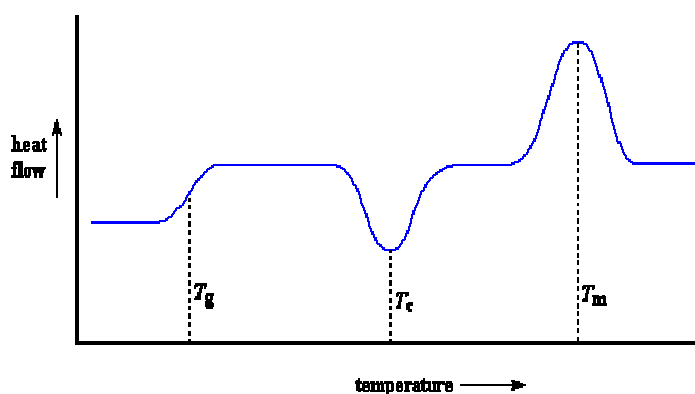


Fig. 19: Tipica curva DSC

Nella maggior parte degli strumenti DSC l'apparecchiatura è costituita da un'unica cella, da una fornace programmabile, da un registratore e da un sistema di raffreddamento e controllo, solitamente in azoto liquido.

I campioni, contenuti in opportune capsule, sono collocati su delle apposite piattaforme (dischi di cromo) poste simmetricamente all'interno della base della cella (disco di costantana) e munite di termocoppie per la misura della temperatura. La differenza di temperatura viene ricavata misurando la differenza di potenziale tra il filo di cromo e quello di alluminio connessi a ciascun disco di cromo.

Nel caso specifico, l'analisi sui campioni è stata effettuata mediante il calorimetro a scansione differenziale della TA INSTRUMENT mod. Q 1000, rappresentato in fig. 20, accoppiato con un sistema di raffreddamento ad azoto liquido.

Questo è un DSC di nuova generazione caratterizzato da una tecnologia avanzata rispetto ai DSC tradizionali principalmente per quanto riguarda le celle. Queste sono munite di una terza termocoppia in cromo e costantana posta in mezzo tra le piattaforme del riferimento e del campione, che a differenza dei DSC tradizionali, sono rialzate rispetto al disco di costantana. Tutto ciò consente una maggiore precisione e sensibilità dello strumento.

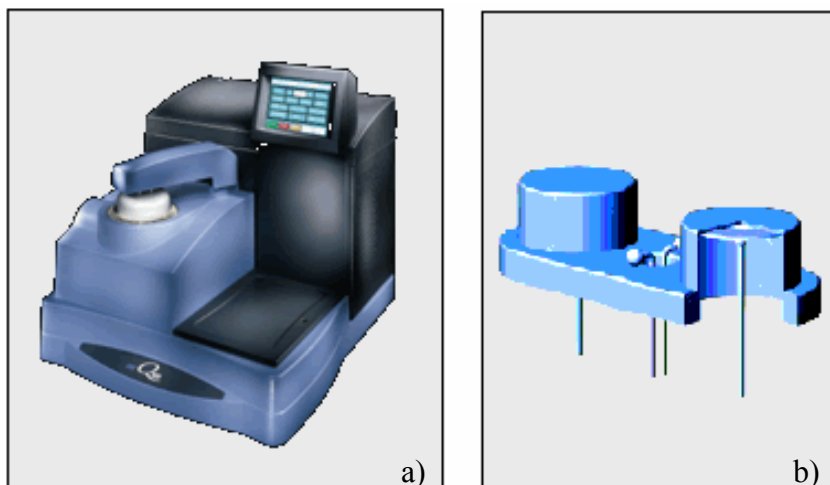


Fig. 20: a) Q 1000; b) piattaforme rialzate del campione

2.7.4 Analisi dell'efficienza del crosslinking: FTIR

Per valutare l'efficienza del crosslinking effettuato sulle microsfere in gelatina mediante l'utilizzo di gliceraldeide sono state effettuate delle analisi dei movimenti dei legami presenti nella gelatina prima e dopo la reazione di crosslinking. La deposizione di uno strato di idrossiapatite su campioni in polvere è stata valutata attraverso la Spettroscopia Infrarossa (FTIR). I campioni per l'analisi sono stati preparati per compressione di una miscela ottenuta mescolando 2.0 mg di microsfere con 200.0 mg di KBr (trasparente alla radiazione infrarossa). La pasticca così ottenuta è stata analizzata impiegando uno spettrofotometro Nexus, con una risoluzione di 4 cm^{-1} e 50 scansioni.

Principio di funzionamento dello spettrofotometro FTIR:

La spettroscopia IR costituisce un potente mezzo di indagine nello studio dei materiali in quanto consente di analizzare le sostanze presenti in un materiale. L'assorbimento della radiazione infrarossa da parte di una sostanza comporta una variazione degli stati vibrazionali molecolari. Descrivendo le vibrazioni molecolari come vibrazioni normali, tutto il movimento vibrazionale di un insieme molecolare di m atomi è descritto da un numero di gradi di libertà vibrazionali pari a $3m-6$ se è non lineare, $3m-5$ se è lineare.

La teoria delle vibrazioni molecolari ammette che un legame chimico fra due atomi possa essere descritto come un oscillatore armonico, tale che la forza di richiamo tra due

atomi sia di natura elastica e descritta dalla legge di Hooke, $F=-kx$, dove k è la costante di forza e in questo caso è un indice della forza di legame. Si dimostra che il numero d'onda n dell'oscillatore è correlato alla costante di forza k e alla massa ridotta μ secondo la relazione:

$$n = \lambda^{-1} = (2\pi c)^{-1}(k/\mu)^{1/2} \quad \text{con} \quad \mu = m_1 m_2 / (m_1 + m_2)$$

Esiste un buon accordo tra le frequenze calcolate con il modello dell'oscillatore armonico e quelle trovate sperimentalmente.

La legge che regola l'assorbimento della radiazione da parte di un solido è quella di Lambert-Beer secondo la quale :

$$I/I^0 = \exp(-k_\lambda l)$$

Dove I è l'intensità della radiazione trasmessa, I^0 quella della luce incidente, l è lo spessore del mezzo dielettrico, k_λ il coefficiente di estinzione che misura la tendenza della sostanza ad assorbire la radiazione di lunghezza d'onda λ . L'intensità generalmente espressa come trasmittanza $T_\lambda = I/I^0$. Considerando la trattazione quantomeccanica dell'oscillatore armonico e tenendo conto del fatto che a temperatura ambiente l'unico livello vibrazionale sufficientemente popolato è quello per cui $v=0$ (v è il numero quantico vibrazionale), l'unica transizione sufficientemente intensa per una vibrazione lungo una stessa direzione, è quella relativa alla transizione $v_{0 \rightarrow 1}$. Ciò è espresso dalla regola di selezione che indica come attive solo le transizioni tra livelli vibrazionali adiacenti. La regola di selezione determina l'assorbimento, la cui intensità dipende dal numero relativo di molecole che si trovano nello stato da cui ha origine la transizione rispetto a quello dello stato di arrivo (cioè la popolazione dei livelli), dalla concentrazione effettiva delle molecole che assorbono (cioè la legge di Lambert-Beer) e dalla variazione del momento elettrico che si verifica durante la vibrazione. Dunque l'intensità dell'assorbimento è un indice della mobilità degli elettroni di legame sotto l'effetto della vibrazione e quindi un indice indiretto della densità elettronica di legame. Gli assorbimenti di molecole poliatomiche che appaiono in uno spettro infrarosso possono avere origine principalmente da vibrazioni lungo un ben definito legame oppure dalla combinazione fra di loro di vibrazioni di legami adiacenti, generando il fenomeno dell'accoppiamento vibrazionale. L'accoppiamento vibrazionale avviene soltanto fra due o più legami che siano fra loro sufficientemente vicini nella struttura molecolare e che siano di energia vibrazionale paragonabile.

L'insieme delle vibrazioni può avvenire lungo le direzioni di legami (mantenendo così immutata la geometria molecolare) e in tal caso si parla di bande di stiramento o stretching oppure le vibrazioni si combinano in maniera tale da generare una deformazione degli angoli di legame (quindi della geometria molecolare) e in tal caso si parla di bande di deformazione o bending. Le vibrazioni di deformazione richiedono un'energia inferiore rispetto a quelle di stiramento visto che la densità elettronica è concentrata lungo l'asse di legame.

Detto ciò, si deduce che al crescere del numero di atomi di una molecola aumenta il numero delle vibrazioni normali, ma composti diversi che hanno un particolare gruppo o un legame in comune mostrano sempre bande di assorbimento, attribuibili a quel gruppo, simili sia in intensità sia in frequenza. Si conclude che un gruppo funzionale corrispondente ad un certo legame chimico assorbe sempre in una regione ben definita dello spettro infrarosso indipendentemente dalla natura del resto della molecola (approssimazione di gruppo). Ogni volta che c'è un assorbimento di raggi infrarossi da parte di un gruppo o di un legame si ha una corrispondente diminuzione della trasmittanza. I picchi di trasmittanza sono più marcati per le bande di stretching che per quelle di bending a causa dei valori diversi di energia richiesti dal tipo di vibrazione. Del resto ciò si può desumere anche dalla legge di Lambert-Beer: infatti, quanto maggiore è il coefficiente di estinzione, tanto minore risulta il valore della trasmittanza. Si sottolinea che lo spettro infrarosso di un materiale amorfo è caratterizzato dalla distribuzione di valori, relativi agli angoli di legame, che sono molto vicini tra loro; non si osservano più bande strette e ben definite relative ad uno specifico assorbimento, ma bande allargate (broad) dovute alla fusione di bande adiacenti.

2.7.5 Analisi proprietà di swelling delle microsfere

Il processo di swelling dinamico delle microsfere è stato studiato misurando la variazione del diametro delle microsfere immerse in acqua a diversi intervalli di tempo. Per analizzare la capacità delle microsfere di assorbire acqua, esse sono state sospese in acqua distillata per diversi intervalli di tempo a temperatura corporea (37°C). A intervalli di tempo prestabiliti, sono state acquisite le immagini delle microsfere al microscopio ottico e analizzate mediante il programma ImageJ (vedi paragrafo 3.7.2.).

Le immagini acquisite mediante microscopio ottico vengono trasformate in immagini 8-bit. In seguito viene effettuato un threshold dell'immagine per ottenere un contrasto di colori in modo da poter calcolare l'area delle immagini selezionate (Fig. 18).

Una volta ottenuta l'area delle microsfere ad ogni fissato intervallo di tempo viene effettuata una media dei valori e calcolato il volume delle microsfere.

Infine, il rapporto di swelling (Swelling Ratio SR %) viene calcolato mediante la formula seguente:

$$SR(\%) = \frac{V_0 - V_t}{V_0} \cdot 100$$

2.7.6 Analisi del rilascio di IGF-1 dalle microsfere lisce

Il rilascio di IGF-1 dalle microsfere lisce in gelatina è stato studiato in soluzione fisiologica salina (PBS) standard a diversi intervalli di tempo mediante Kit ELISA specifico per IGF-1.

La procedura per l'analisi della cinetica di rilascio consta delle seguenti fasi:

- 1) vengono accuratamente pesati 20 mg di microsfere anidre contenenti IGF-1 e introdotte in un eppendorf da 1,5 ml ;
- 2) vengono aggiunti 100 µl di PBS;
- 3) il campione viene incubato a 37°C ;
- 4) ad intervalli di tempo regolari i campioni vengono centrifugati per 30 min ad una velocità di 10000 rpm per facilitare la deposizione delle microsfere e il prelievo del surnatante;
- 5) da ogni campione vengono prelevati 50 µl di surnatante e conservati a -80°C per effettuare le misure del rilascio in seguito;
- 6) ad ogni campione analizzato vengono aggiunti 50 µl di acqua bidistillata per il ripristino del volume iniziale;
- 7) i campioni vengono nuovamente incubati a 37°C.

L'ammontare di fattore di crescita presente nel surnatante viene determinato mediante correlazione con la retta di taratura. Il rilascio cumulativo è stato ottenuto normalizzando il fattore di crescita totale rilasciato ad ogni intervallo di tempo con la

somma del fattore di crescita totale rilasciato in 28 giorni e quello rimanente nei campioni al giorno ventottesimo.

Principio di funzionamento KIT ELISA

Il saggio ELISA specifico per il fattore di crescita IGF-1 umano viene utilizzato per determinare la concentrazione di quest'ultimo nei surnatanti delle colture cellulari, sieri, plasma e altre soluzioni.

Viene utilizzata una micropiastra rivestita con un anticorpo monoclonale specifico per IGF-1. I campioni di controllo e pretrattati vengono spipettati nelle piastre e tutto l'IGF-1 presente si lega all'anticorpo immobilizzato. Dopo aver lavato via tutte le sostanze non legate, un anticorpo policlonale legato ad un enzima, specifico per IGF-1, viene aggiunto alle piastre. In seguito a lavaggio per rimuovere tutte le sostanze reagenti anticorpo-enzima non legate, viene aggiunta alle piastre una soluzione di base. Tale soluzione colora la piastra in proporzione alla quantità di IGF-1 legata durante lo step iniziale. Lo sviluppo del colore viene fermato e l'intensità del colore viene misurata.

Preparazione dei reagenti

1. Soluzione acquosa tampone – Se si sono formati dei cristalli nella soluzione concentrata, bisogna riscaldarla a temperatura ambiente e miscelarla fin quando i cristalli non si sono completamente disciolti. Bisogna poi diluire 20 ml di soluzione acquosa tampone concentrata in acqua deionizzata o distillata per ottenere 500 ml di soluzione acquosa tampone.
2. Soluzione di base – I reagenti colori devono essere miscelati insieme in volumi uguali entro 15 minuti dall'uso e protetti dalla luce. Sono richiesti 200 µl di tale miscela per well.
3. Pre-trattamento B – Ricostituire il pre-trattamento B con 10 ml di acqua deionizzata o distillata e lasciarlo per 10 min sotto una leggera agitazione prima di usarlo.
4. IGF-1 Standard – Ricostituire l'IGF-1 standard con 1.0 ml di acqua deionizzata o distillata. Questa ricostituzione produce una soluzione stock di 60 ng/ml.

Lasciare per un minimo di 15 minuti sotto leggera agitazione prima di effettuare le diluizioni.

5. Spipettare 360 μl di Diluente Calibratore in un tubo da 6 ng/ml e 200 μl nei tubi rimanenti. Utilizzare la soluzione stock per realizzare una serie di diluizioni (Fig. 21). Miscelare ciascun tubo prima di effettuare il passaggio seguente. Lo standard di 6 ng/ml viene utilizzato come concentrazione massima. Il Diluente Calibratore viene utilizzato come concentrazione zero (0 ng/ml)

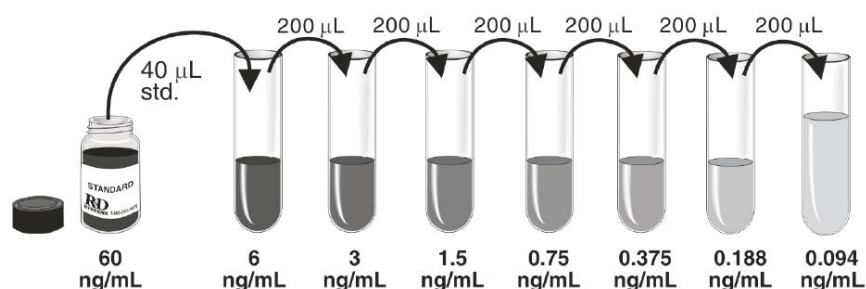


Fig. 21: Diluizioni della soluzione di IGF-1

Procedura del saggio

1. Preparare tutti i reagenti come visto nel paragrafo precedente.
2. Aggiungere 150 μl del Diluente ad ogni well
3. Aggiungere 50 μl di Standard, controllo o campione per well. Incubare per 2 h a 2-8°C.
4. Aspirare ogni well e lavare, ripetere il processo tre volte per un totale di quattro lavaggi
5. Dopo l'ultimo lavaggio rimuovere ogni rimanenza di soluzione acquosa tampone mediante aspirazione
6. Aggiungere 200 μl di IGF-1 coniugato freddo ad ogni well ed incubare per 1 h a 2-8°C
7. Ripetere i lavaggi come nello step 4
8. Aggiungere 200 μl di Soluzione di base ad ogni well ed incubare per 30 min a temperatura ambiente. Proteggere dalla luce.

9. Aggiungere 50 μ l di Soluzione Stop ad ogni well (per fermare la colorazione). Il colore della soluzione nelle well dovrebbe cambiare da blu a giallo. Se il colore nelle well è verde o se il colore non sembra uniforme, miscelare delicatamente.
10. Determinare la densità ottica di ciascuna well entro 30 minuti utilizzando una micropiastra di lettura a 450 nm mediante spettrofotometro.

Calcolo dei risultati

Fare la media delle letture in duplicato per ogni standard, controllo e campioni e sottrarre la media della densità ottica dello standard a zero. Diagrammare la densità ottica per gli standard verso la concentrazione degli standard e fittare i dati. I dati possono essere linearizzati utilizzando un diagramma log/log e la regressione dell'analisi può essere applicata alla trasformazione logaritmica. Per determinare la concentrazione di IGF-1 di ogni campione, bisogna innanzitutto determinare il valore dell'assorbanza dall'asse y ed estendere una linea orizzontale verso la retta di taratura. Al punto d'intersezione, estendere una linea verticale verso l'asse delle x e leggere il corrispondente valore di concentrazione dell'IGF-1. In questo modo è possibile ricostruire la curva che riporta la concentrazione di IGF-1 in funzione del tempo per avere il profilo di rilascio di IGF-1 dai campioni a differenti intervalli di tempo.

Principio di funzionamento Spettrofotometro

I metodi di analisi spettrochimici sono basati sull'analisi dello spettro delle sostanze, il quale può essere di emissione o di assorbimento. Infatti ogni sostanza assorbe o emette radiazioni di lunghezza d'onda ben determinata, l'analisi dello spettro permette allora di individuare la natura della sostanza in esame, la misura dell'intensità delle radiazioni emesse o assorbite permette di risalire alla quantità di sostanza analizzata. Per l'analisi sperimentale effettuata è stato utilizzato uno spettrofluorimetro Perkin-Elmer. serie VICTOR 3 mod.Wallac 1421.

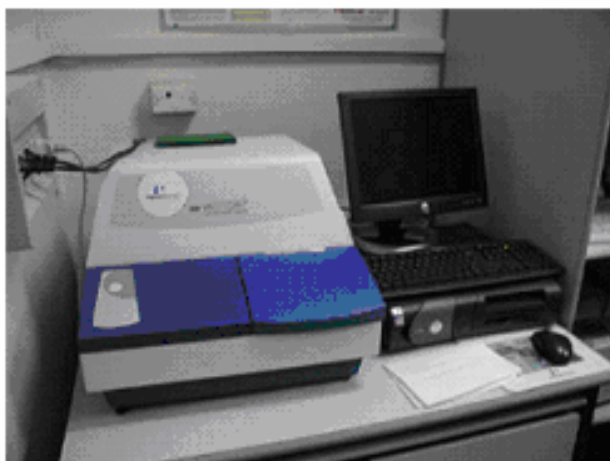


Fig. 22: Spettrofotometro

La sorgente luminosa, **“light source”**, è impiegata per massimizzare l'energia di eccitazione che raggiunge i campioni. La luce emessa dalla sorgente luminosa viene focalizzata su un **“monocromatore”** per la selezione della lunghezza d'onda desiderata. I monocromatori permettono la selezione di qualsiasi lunghezza d'onda variabile tra 200 nm e 1000 nm. Successivamente la luce emessa attraversa una fenditura posta nel fuoco del **“collimatore”**. Le lenti del collimatore rendono paralleli i raggi uscenti dalla fenditura e li inviano all'elemento dispersivo, **“prisma”**, che devia i singoli raggi in funzione della loro lunghezza d'onda. La luce che colpisce i campioni e quella che proviene da essi, viene focalizzata per mezzo di un'unica lente. La luce emessa dal campione viene amplificata da un tubo fotomoltiplicatore **“PMT**. I dati rilevati sono poi trasmessi al computer di controllo e l'analisi viene attuata da un software di riduzione dei dati. In fig. 23 è riportato uno schema a blocchi di uno spettrofluorimetro:

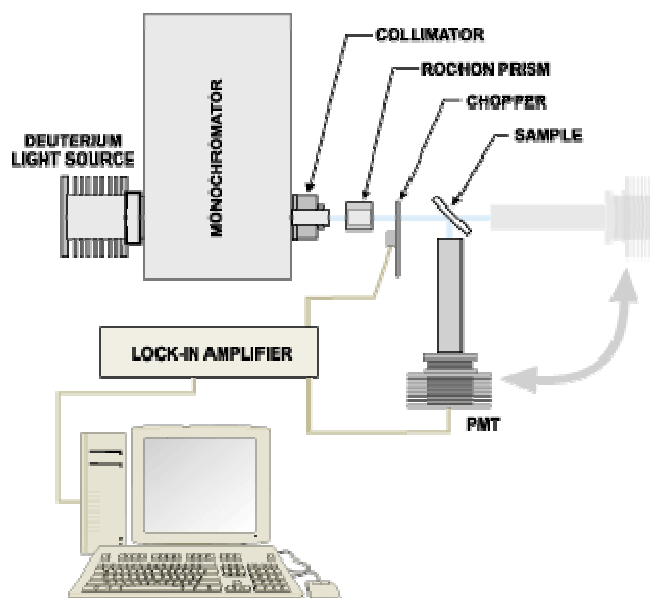


Fig. 23 : Schema rappresentativo del principio di funzionamento dello spettrofotometro

2.7.7 Test di citotossicità dell'agente crosslinkante - Coltura fibroblasti su microsfere lisce

Le microsfere in gelatina vengono idratate in soluzione salina (PBS) (*OXOID ph 7,3*) per un'ora. In seguito i microcarrier vengono autoclavati a 121°C per 15 min e pre-incubati nel mezzo di coltura delle cellule a 4°C overnight. Per quanto concerne la coltivazione dei microcarrier, una sospensione di microsfere di gelatina pretrattate e di fibroblasti, con un rapporto di 2×10^5 cellule per mg di microsfere, viene versata in una piastra batterica di 60 mm, in modo da evitare l'adesione delle cellule sul fondo del disco. Le piastre sono incubate a 37°C in uno shaker orizzontale alla velocità di 50 rpm. Ad intervalli di due giorni, il mezzo viene attentamente rimosso sotto vuoto e ne viene aggiunto del nuovo. Ogni giorno i campioni sono osservati al microscopio ottico ed a intervalli regolari vengono sottoposti ad analisi morfologica.

2.7.8 Coltura cellule mesenchimali staminali (MSC) su microsfere porose in gelatina

La scelta delle microsfere in gelatina come substrato per la coltura cellulare è dovuto essenzialmente alla loro peculiarità di possedere un elevato rapporto area

superficiale/volume. Questa si traduce nella presenza di un'elevata superficie per l'adesione e crescita cellulare di un'ampia varietà di cellule. Inoltre, le microsfere in gelatina sono delle matrici biologicamente inerti che forniscono un substrato forte ma non rigido per la coltura cellulare in agitazione. Inoltre, le strutture macroporose sono in grado di proteggere le cellule dalle forze di shear.

2.7.8.1. Densità cellulare

Giornalmente 1 ml di sospensione viene raccolta dalle spinner flask in un tubo Eppendorf nel quale le microbiglie vengono fatte sedimentare. Il surnatante viene rimosso e risospeso per contare la concentrazione di cellule non adese alle microbiglie e ancora libere in sospensione. Le microbiglie vengono invece contate in un'apposita griglia (Nunc), lavate in PBS e infine trattate con 1ml di tripsina (0.25%) + EDTA (1mM) a 37°C per 15 min per rimuovere le cellule attaccate. Le cellule rimosse dalle biglie vengono poi contate con un ematocimetro. In questo modo è possibile risalire al numero di cellule adese per biglia.

2.7.8.2. Vitalità cellulare: Colorazione con MTT

3-(4, 5_dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) è utilizzato per monitorare la vitalità cellulare sulle microbiglie. Ad 1ml di sospensione prelevato dalla spinner flask viene aggiunto 100µl di MTT 5 mg/ml, quindi la soluzione è incubata per 45 min a 37°C per far sì che l'MTT agisca colorando le cellule vitali. Successivamente i campioni vengono osservati e fotografati al microscopio ottico.

Principio di funzionamento MTT

Il test MTT è un saggio colorimetrico quantitativo per la vitalità e proliferazione cellulare e si basa sulla riduzione enzimatica del sale di tetrazolio da parte di cellule vive e metabolicamente attive. Il sale di tetrazolio, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), viene assorbito dalle cellule e ridotto da parte dell'enzima succinato deidrogenasi che appartiene alla catena respiratoria dei

mitocondri per produrre formazano. L'abilità delle cellule di ridurre l'MTT fornisce un'indicazione dell'integrità e dell'attività mitocondriale che, di riflesso, può essere interpretata come una misura del numero delle cellule presenti nel materiale e della loro vitalità. Valutando, quindi, la concentrazione di formazano si ha un'indicazione quantitativa della vitalità cellulare. Come tutte le indagini biochimiche che fruttano reazioni enzimatiche, l'MTT è un test molto semplice, preciso e sicuro. Agli scaffold cellularizzati dopo 72h di incubazione viene aggiunta una soluzione di MTT in DMEM al 10% che viene lasciato per 3 ore. I cristalli di formazano, impermeabili alle membrane cellulari e insolubili in acqua, vengono rilasciati utilizzando un opportuno solvente (0.1N HCl in isopropanolo). La concentrazione di formazano in soluzione, dal colore molto acceso (porpora), può essere misurata utilizzando uno spettrofotometro (*Perkin-Elmer*) a 570nm.

2.7.8.3. Istologia

1 ml di sospensione di microbiglie seminate con MSC viene prelevata dalle spinner flask e viene posta in un tubo Eppendorf, le microbiglie vengono fatte sedimentare e il surnatante viene eliminato. Le microbiglie vengono sciacquate in PBS e poi fissate in formalina. Al fissaggio segue una disidratazione in una serie crescente di alcool (75°, 85°, 96°, 100°) e il fissaggio in paraffina. Sezioni di 5 µm ciascuna sono ottenute mediante taglio al microtomo e sottoposte ad analisi morfologica mediante colorazione con ematassolina/eosina.

2.7.8.4. Analisi ESEM campioni biologici

1 ml di sospensione di microbiglie seminate con MSC viene prelevata dalle spinner flask e viene posta in un tubo Eppendorf, le microbiglie vengono fatte sedimentare e il surnatante eliminato. Le microbiglie vengono fissate con gluteraldeide al 2.5%, il fissaggio è iniziato a temperatura ambiente seguito da conservazione nel fissativo per 3 giorni a 4°C. I campioni sono poi lavati in 100 mM di tampone cacodilato per 10 min a temperatura ambiente. Infine le osservazioni e le micrografie sono effettuate con un microscopio elettronico a scansione ambientale.

Principio di funzionamento microscopio elettronico a scansione ambientale

Il microscopio elettronico a scansione ambientale funziona come il SEM (Paragrafo 3.7.1.). La particolarità consiste nel fatto che l'ESEM consente di analizzare campioni non in vuoto ma immersi in vapore acqueo, a determinate condizioni. Infatti a temperatura di 0 °C e pressione tra 650 e 1300 Pa (Pascal) il vapore acqueo è in equilibrio col campione e non ostacola la visualizzazione, anzi la favorisce. In questa situazione si possono visualizzare campioni molli e anche contenenti acqua, cioè ad esempio campioni biologici, che nel vuoto di un SEM sarebbero distrutti esplodendo e quindi venendo risucchiati dalla pompa; inoltre i campioni possono essere isolanti, cosa che nel SEM crea problemi perché sugli isolanti bombardati da elettroni si accumulano cariche elettriche che poi non vengono rilasciate (perché negli isolanti queste non sono libere di muoversi e defluire via), mentre gli ioni dell'acqua in sospensione nell'ESEM aiutano a "pulire il segnale" da questo problema, in quanto fungono da "spazzini", poiché si muovono evitando l'accumulo di cariche di disturbo che vengono da essi trasportate via. E' stato, quindi, possibile osservare con questo strumento le cellule ancora adese alle microsfele porose.

2.7.8.5. Analisi Confocale campioni biologici

La distribuzione delle cellule sulle microbiglie è stata osservata dopo 3 giorni di coltura mediante Microscopio Confocale a Scansione Laser (CLSM 510, Carl Zeiss, Germany). Per visualizzare le cellule mediante il microscopio confocale, le cellule sono state incubate in una soluzione di 5 mg/ml di fluoresceina diacetata (FDA)/PBS per 10 min. Durante questo processo, FDA (non fluorescente) può penetrare attraverso la membrana cellulare e viene idrolizzata in fluoresceina dalle cellule vitali, che vengono in seguito eccitate a 488 nm al confocale [109].

Principio di funzionamento microscopio confocale

In un microscopio confocale la luce di un laser viene fatta convergere dalle lenti dell'obiettivo in un punto estremamente piccolo del campione osservato. Il punto stesso,

attraverso un sistema di specchi oscillanti, viene spostato attraverso tutto il campo visivo dell'obiettivo così da effettuare una scansione completa di tutto il piano focale.

Diversamente da quanto avviene in un microscopio tradizionale, in un microscopio a fluorescenza la sorgente luminosa è laser. Grazie alla piccolissima area di campione analizzata, la risoluzione è molto alta e le caratteristiche della luce risultante (estrema coerenza, alta intensità e lunghezza d'onda unica) consentono di evitare i fenomeni di aberrazione e diffrazione tipiche della luce prodotta dalle lampade a incandescenza.

Il laser eccita i soli fluorocromi appartenenti al piano focale, corrispondenti al punto di massima concentrazione del raggio; in questo modo le sezioni non appartenenti al tale piano non vengono eccitate e il risultato complessivo è una riduzione degli aloni e del rumore di fondo [110].

Il principio di funzionamento di un microscopio confocale può essere schematizzato come segue (fig. 24):

- ✓ La luce, emessa dal laser, è deviata dallo specchio diroico
- ✓ Dopo, la luce investe il campione, eccitandolo. I suoi fluorocromi emettono una radiazione luminosa la quale, catturata dalle lenti dell'obiettivo, colpisce lo specchio diroico. Attraverso questo la luce riflessa è deviata mentre la luce fluorescente passa attraverso il pinhole e un filtro, giungendo al fotomoltiplicatore.
- ✓ Il pinhole funge da diaframma e impedisce che la luce proveniente dalle zone fuori fuoco raggiunga il fotomoltiplicatore. In questo modo solo il segnale luminoso relativo al piano focale contribuisce alla formazione dell'immagine finale. E' comunque presente un minimo contributo delle zone fuori fuoco dovuto a fenomeni di rifrazione all'interno del campione.
- ✓ Il fotomoltiplicatore trasforma l'intensità luminosa rilevata in un segnale elettrico proporzionale all'intensità stessa.
- ✓ Il segnale elettrico uscente dal fotomoltiplicatore è poi digitalizzato e inviato ad un computer che registra l'intensità luminosa in ogni punto. Questi valori di intensità sono utilizzati per ricostruire l'immagine video: ogni punto del campione corrisponde ad un pixel, e l'intensità luminosa di ogni punto è rappresentata da un certo tono di grigio. L'accostamento di tutti i singoli pixel analizzati fornisce l'immagine finale.

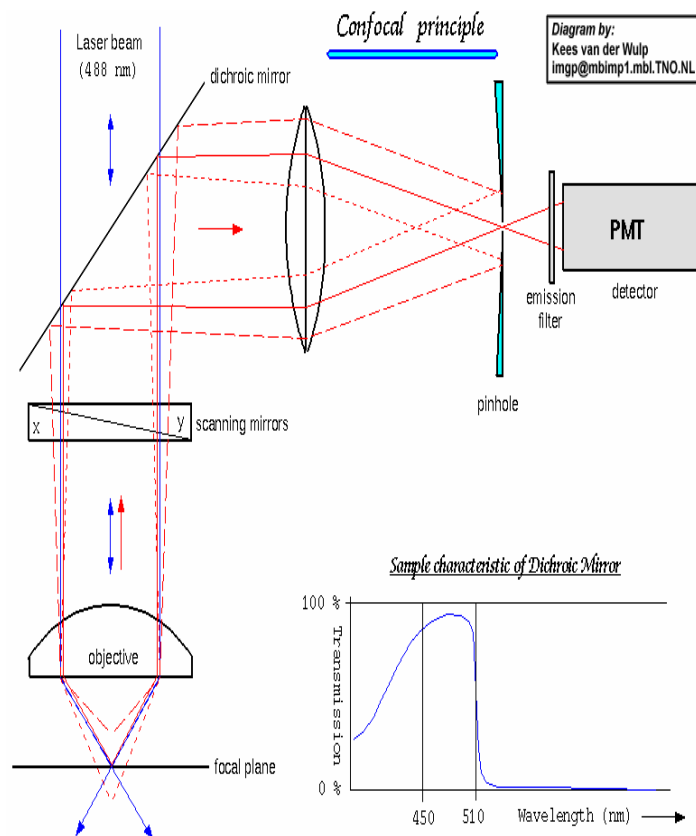


Fig. 24: Principio di funzionamento di un microscopio confocale

- ✓ Spostando il campione lungo l'asse verticale dopo ogni scansione è possibile effettuare scansioni di differenti piani focali. Queste scansioni sono dette sezioni ottiche e la loro unione, eseguita via software, consente di ricostruire un'immagine complessiva dell'intero volume, in cui tutti i piani sono contemporaneamente a fuoco. Questa è l'*acquisizione* del volume. (Fig. 25) [111].

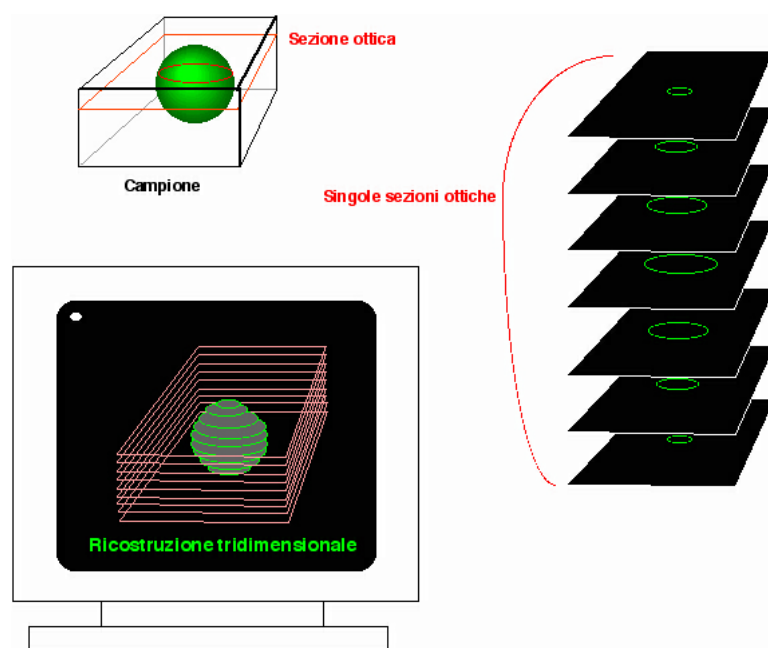


Fig. 25: Sezioni ottiche e ricostruzione 3D di un'immagine al confocale

L'immagine acquisita può essere successivamente elaborata per quanto riguarda la regolazione del contrasto, cromia, e rotazione virtuale del volume acquisito attraverso la scansione. È inoltre possibile effettuare un controllo delle dimensioni dei campioni.

I campioni utilizzati per l'analisi con la LSCM devono essere marcati con un *probe* (o dye) fluorescente. Nella scelta del probe da utilizzare è necessario considerare le lunghezza d'onda di eccitazione ed emissione, le linee di laser disponibili, i filtri da utilizzare e la possibilità che, una volta legata al probe, la molecola possa presentare caratteristiche differenti.

Un problema a cui può andare incontro un campione da analizzare al microscopio confocale è il bleaching del marcatore fluorescente. Per bleaching si intende lo spegnimento irreversibile della fluorescenza, legato all'elevata potenza del laser che investe il campione [112].

2.7.9 Impianto *in vivo*

2.7.9.1 Studi istologici campioni in vivo

Dopo 7 giorni dall'infarto, gli animali profondamente anestetizzati, sono stati sottoposti ad eutanasia. Il miocardio è stato rapidamente rimosso, fissato in formalina al 4% e incluso in paraffina. I campioni sono stati tagliati al microtomo in sezioni trasverse dallo spessore di 6-7 μm per poi essere distese sui vetrini polilisinati utilizzati per le successive indagini. Per ogni animale sono state ottenute sezioni a 3 livelli: porzione superiore, centro ed apice. Ad ogni livello, sono state valutate almeno 20 sezioni, su cui sono state eseguite 2 colorazioni istochimiche in grado di evidenziare specifiche strutture cellulari.

Ai fini sperimentali, le sezioni ottenute da tessuti inclusi in paraffina richiedono un pretrattamento inteso ad allontanare il mezzo d'inclusione, che rappresenta un ostacolo alla corretta esecuzione delle varie reazioni, soprattutto in ragione della sua relativa impermeabilità. La paraffina è stata rimossa immergendo per cinque minuti i vetrini in Histolemon per due volte; un trattamento troppo breve può lasciare nel tessuto residui di paraffina, che appaiono come strutture similcristalline e birifrangenti. Dopo tale trattamento i vetrini sono stati lavati in alcool etilico assoluto e passati in alcool 95°, 75° e 50° ed infine sono stati immersi in H₂O distillata. Le sezioni ormai prive del mezzo d'inclusione sono pronte per le reazioni successive.

Le colorazioni eseguite sui vetrini sono state le seguenti:

Ematossilina/eosina: colora in varie tonalità di blu le strutture nucleari ed in rosa il citoplasma e tutte le altre componenti stromali.

Elastic picro sirius red (Epsr): mette in risalto le fibre di collagene in rosso e colora il citoplasma delle cellule in giallo.

2.7.9.2. Valutazione immunoistochimica

La tecnica applicata è quella semidiretta, eseguita utilizzando l'Avidin Biotin Immunoperoxidase Kit (Pierce Lab). Nello specifico, le sezioni sono state sottoposte ad immunoreazione con Fattore VIII, un marcatore delle cellule endoteliali.

2.7.9.3 Valutazione dell'apoptosi

L'apoptosi cardiomiocitaria è stata valutata utilizzando l'annessina V fluorescinata, una proteina che lega selettivamente la fosfatidilserina che trasloca sulla faccia esterna della membrana cellulare già nei primi stadi del processo di morte programmata.

I nuclei cellulari sono stati evidenziati con Ioduro di propidio e le sezioni osservate con il microscopio a fluorescenza Nikon eclipse 1000.

2.7.9.4 Analisi quantitativa

Per ogni colorazione, sono state analizzate un minimo di 20 sezioni campionate a 3 diversi livelli e sono stati misurati i seguenti parametri:

- Diametro ed area dei cardiomiociti, ottenuto da sezioni colorate con ematossilina/eosina;
- % di infarto data dal rapporto della lunghezza della scar rispetto alla circonferenza.

Le misurazioni sono state condotte su immagini digitali, con l'ausilio del software Sigma Scan Pro e di una tavoletta grafica (Wacom Artpad II).

Il software è stato opportunamente calibrato utilizzando un vetrino tarato di riferimento, fotografato allo stesso ingrandimento e alla stessa risoluzione dei campi microscopici oggetto di studio. E' stato valutato il diametro di almeno 50 cardiomiociti per ogni livello di ciascuno degli animali trattati. Sono stati utilizzati solo cardiomiociti in cui fosse evidente il nucleo e con un fattore di rotondità $\geq 0,85$. Il fattore di rotondità è un parametro automaticamente calcolato dal software utilizzato per l'analisi e descrive quanto la cellula selezionata e misurata si avvicini ad una forma circolare perfetta.

La % di infarto è stata determinata su 10 sezioni campionate per ogni livello. Sui valori ottenuti è stata calcolata la media e la deviazione standard.

Capitolo 3

Risultati sperimentali e discussioni

3.1 Singola Emulsione

3.1.1. Analisi morfologica

L'analisi della microstruttura è stata eseguita mediante microscopio a scansione elettronica (SEM) grazie al quale risulta possibile valutare la morfologia delle varie tipologie di campioni.

Di seguito si riportano le micrografie relative alle dieci tipologie di microsfele ottenute mediante singola emulsione; in particolare, per ogni tipologia vengono mostrate due micrografie a differente ingrandimento, al fine di evidenziare la distribuzione dimensionale e la morfologia superficiale delle singole microsfele.

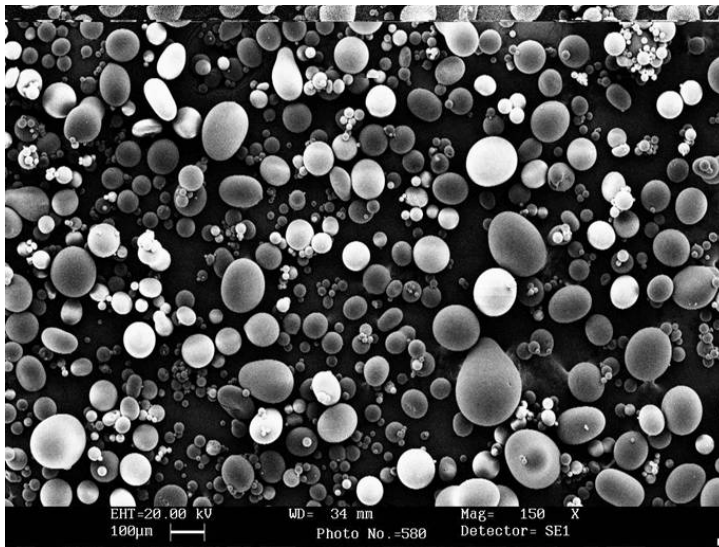


Fig. 1:
Tipologia G₁
150 x

Fig. 2:
Tipologia G₁
1.18 Kx

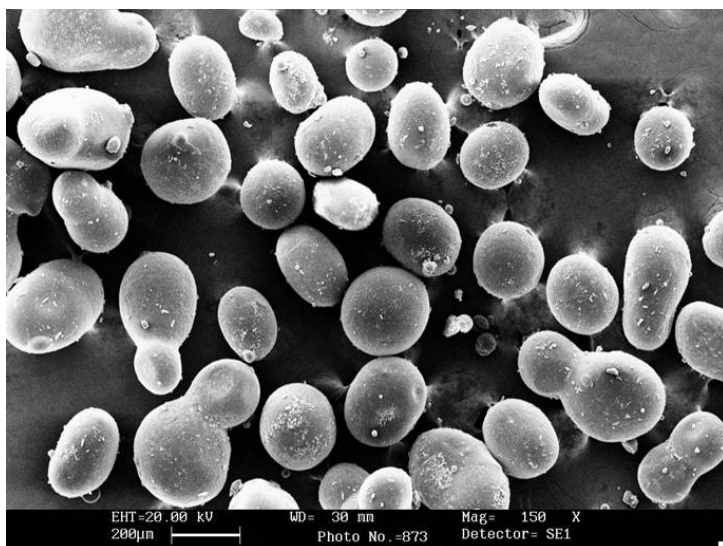
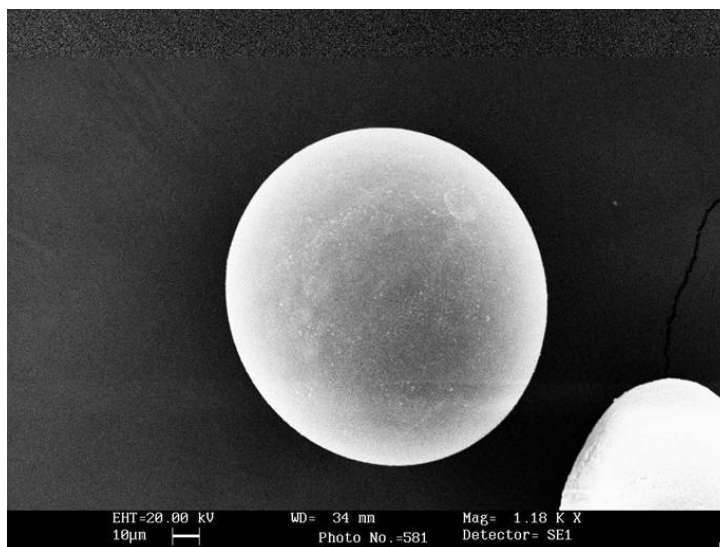
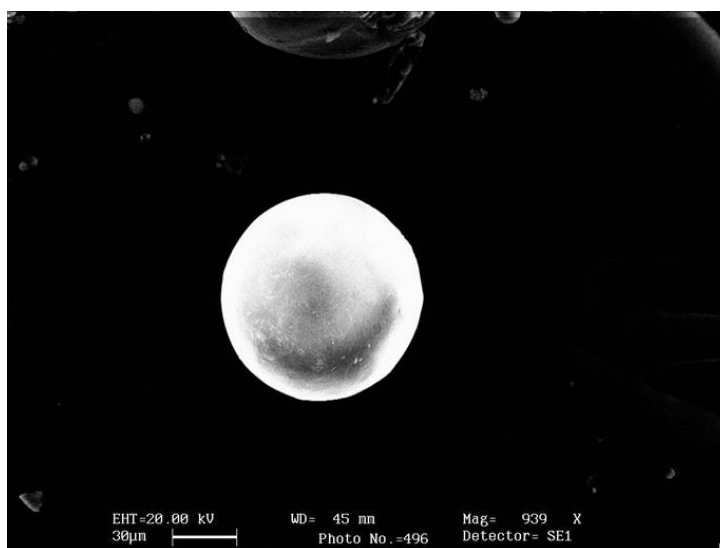


Fig. 3:
Tipologia G₂
150 x

Fig. 4:
Tipologia G₂
939 x



Dalle micrografie si osserva che le microsfele delle tipologie di campioni G1 e G2 presentano forma sferica con superficie liscia e non porosa. Tali particelle ottenute mediante singola emulsione in agitazione meccanica ad 800 rpm hanno dimensioni variabili tra 90 e 150 micron. Si osserva che, variando la percentuale di agente crosslinkante, non vi sono variazioni della morfologia e delle dimensioni delle microsfele. Per determinare in modo preliminare l'efficienza del crosslinking è stata valutata la stabilità termica dei campioni con differenti concentrazioni di gliceraldeide, sottoponendoli ad un trattamento di sterilizzazione in autoclave a 121°C per circa 20 minuti. Il risultato di tale operazione ha dimostrato che all'aumentare della percentuale di agente crosslinkante aumenta la stabilità termica delle microsfele, in quanto al 10% di GAL le particelle si sono sciolte mentre al 20% hanno mantenuto la loro forma e morfologia. Ulteriori esperimenti sono stati condotti variando la velocità e la tipologia di agitazione al fine di variare le dimensioni delle microsfele. In questo caso, l'agente crosslinkante utilizzato è stato la glutaraldeide in quanto agisce come la gliceraldeide ma è più economica. Le condizioni di crosslinkaggio ottimali, ricavate dai primi esperimenti, in modo da rendere le microsfele autoclavabili sono, quindi, il 20% in peso rispetto alla gelatina per 24h.

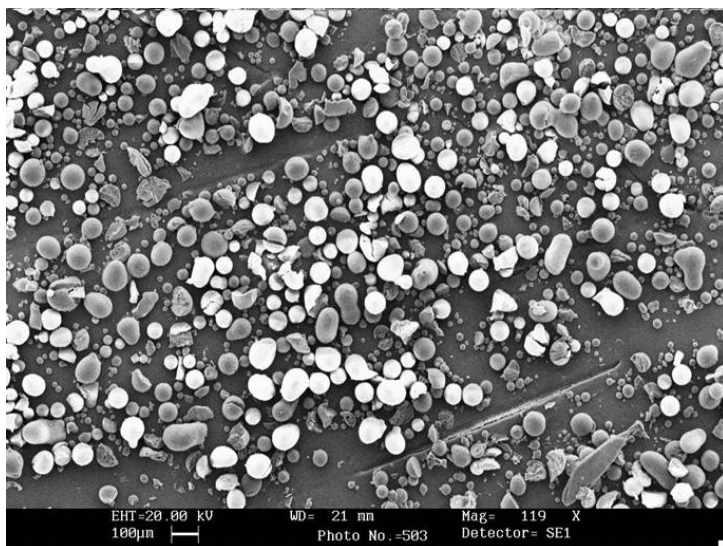


Fig. 5:
Tipologia G₃
119 x

Fig. 6:
Tipologia G₃
939 x

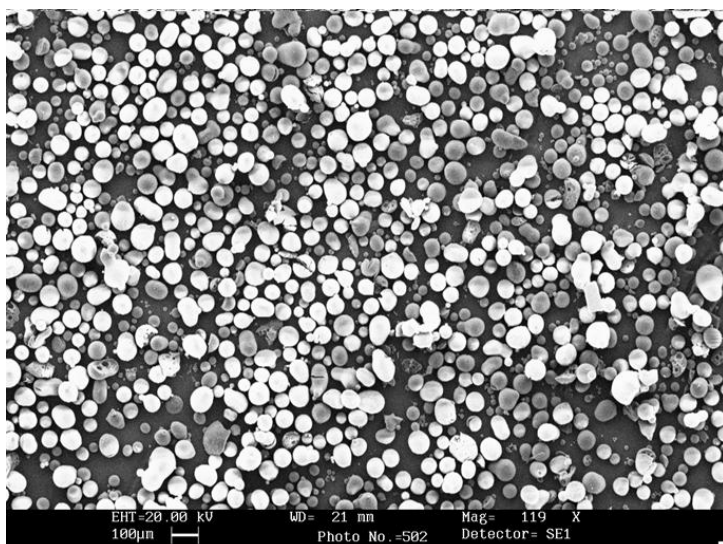
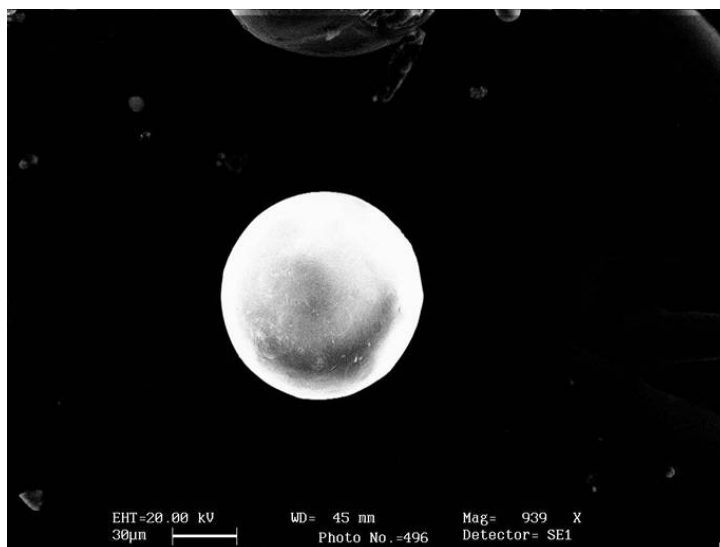
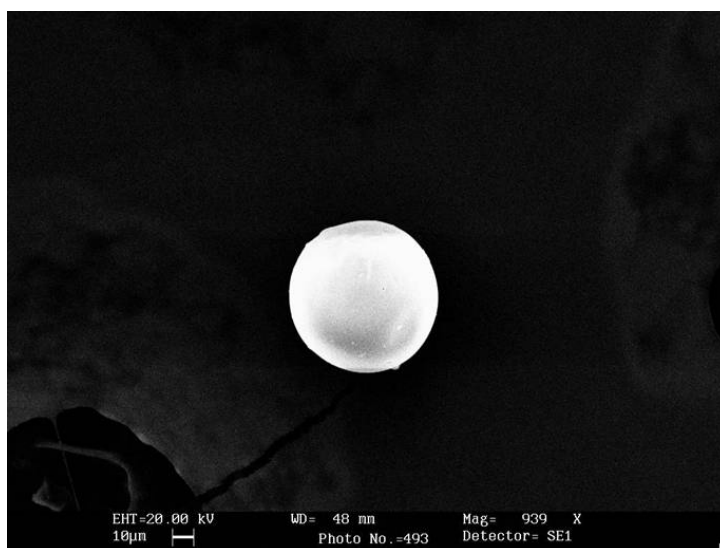


Fig. 7:
Tipologia G₄
119 x

Fig. 8:
Tipologia G₄
939 x



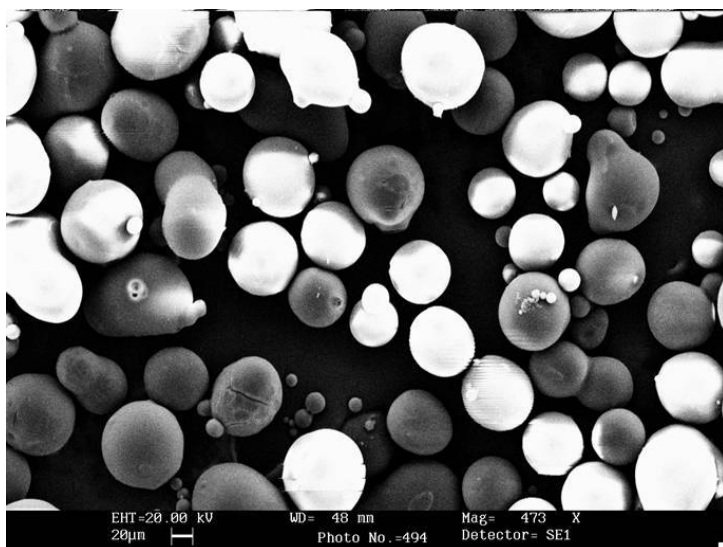


Fig. 9:
Tipologia G₅
473 x

Fig. 10:
Tipologia G₅
939 x

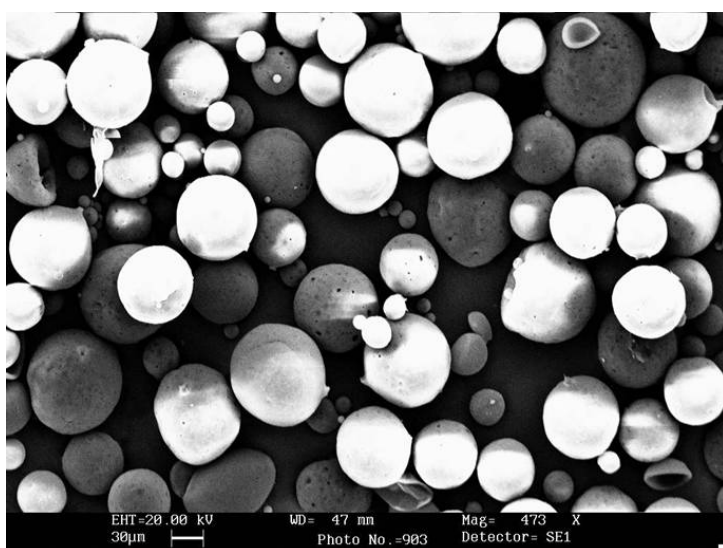
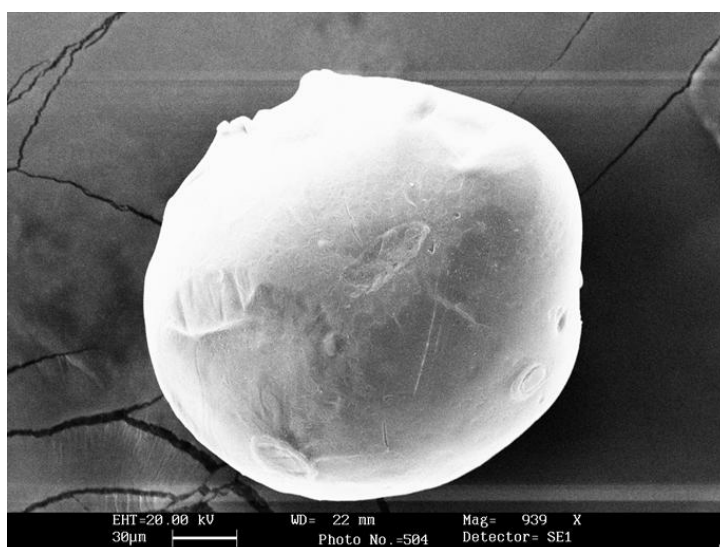


Fig. 11:
Tipologia G₉
473 x

Fig. 12:
Tipologia G₉
939 x

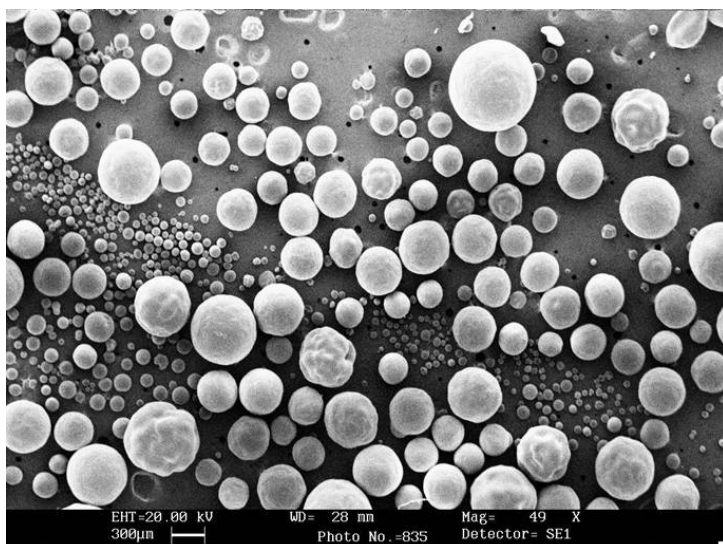
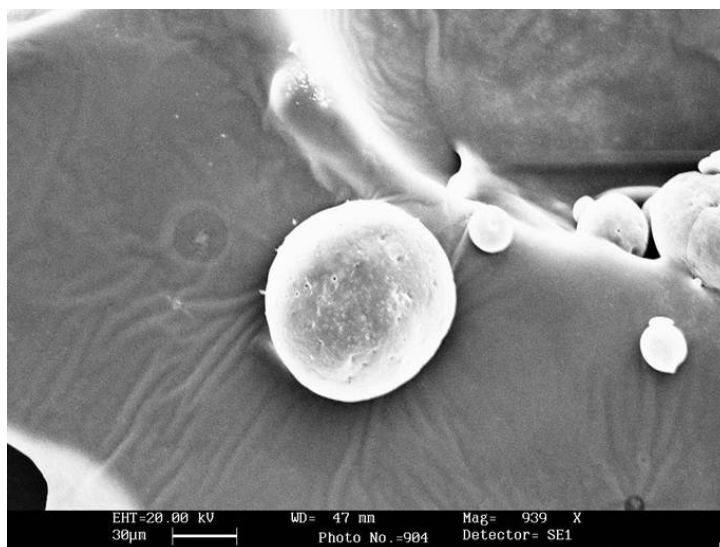
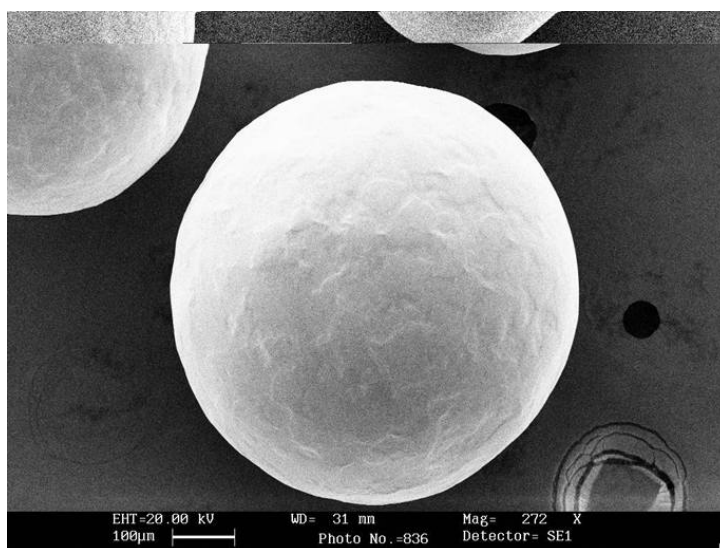


Fig. 13:
Tipologia G₁₀
49 x

Fig. 14:
Tipologia G₁₀
272 x



Al fine di aumentare le dimensioni delle microsfere si è proceduto prima a diminuire la velocità di agitazione meccanica e poi a cambiare la tipologia di agitazione.

Per quanto riguarda le microsfere ottenute mediante singola emulsione in agitazione meccanica, non si osserva una sostanziale differenza delle dimensioni passando da 800 rpm a 400 rpm. Diminuendo ulteriormente la velocità fino a 200 rpm, invece, è possibile osservare che le microsfere hanno dimensione maggiore, fino ad un diametro di circa 200 micron (Fig. 9 e 10). Infine, per effettuare l'emulsione è stato utilizzato un agitatore magnetico a velocità variabile da 800 rpm a 200 rpm e si è riusciti ad ottenere microsfere di diametro fino a circa 600 micron (Fig. 13 e 14).

Inoltre, per ciascuna tipologia di campioni si osserva che la morfologia non cambia al variare della velocità e del tipo di agitazione e che le microsfere ottenute mediante agitazione magnetica presentano una distribuzione dimensionale piuttosto ampia.

Sono stati anche effettuati degli studi per crosslinkare le microsfere in gelatina con un enzima, la transglutaminase (TGase), il quale attiva la formazione di un legame covalente tra i gruppi amminici e carbossilici liberi della proteina. Le percentuali di TGase utilizzate sono del 0,5-10 e 20% in peso. Per quanto riguarda quest'ultima percentuale, ossia la tipologia di campione G8, si è osservato essere eccessiva in quanto le microsfere si sono unite tra loro per cui non è stato neanche possibile prelevarle. Di seguito si riportano le micrografie delle tipologie di campioni G6 e G7.

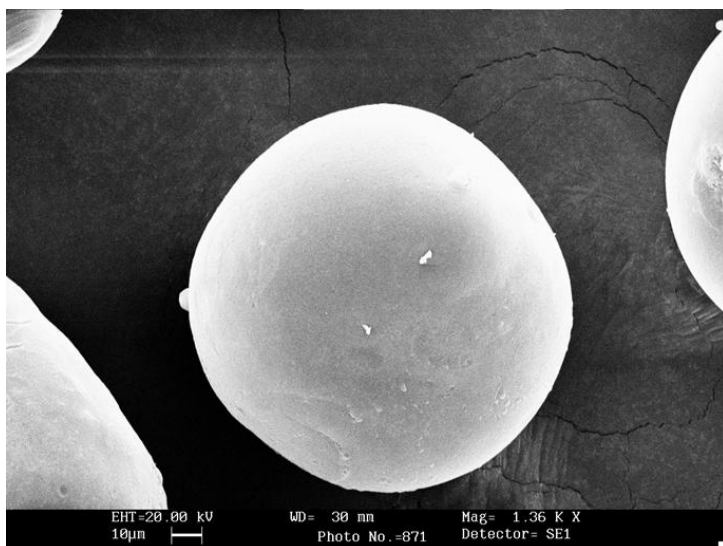
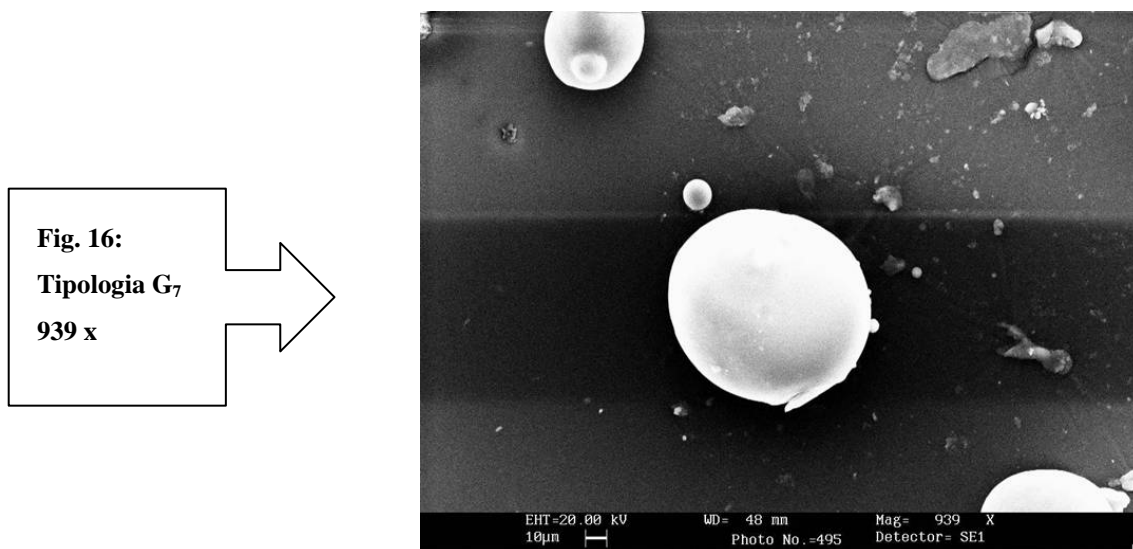


Fig. 15:
Tipologia G₆
1.36 Kx



Dalle figure 15 e 16 si osserva che le microsfele presentano forma sferica con superficie liscia e non porosa e dimensioni variabili tra 90 e 150 micron.

3.1.2. Analisi dimensionale

E' stata effettuata un'analisi quantitativa delle dimensioni delle microsfele ottenute mediante singola emulsione attraverso agitazione magnetica a 800 rpm prima e dopo il trattamento di crosslink con 10% e 20 % di gliceraldeide, per essere sicuri che tale trattamento non abbia influito sulla dimensione delle microsfele ottenute.

L'analisi è stata effettuata mediante un programma per analisi delle immagini, Image J, che ha permesso di valutare il diametro delle microsfele non crosslinkate, crosslinkate con il 10 % di gliceraldeide e con il 20 % di gliceraldeide.

Di seguito si riportano i risultati ottenuti espressi mediante diagramma a barre (Fig. 17, 18 e 19).

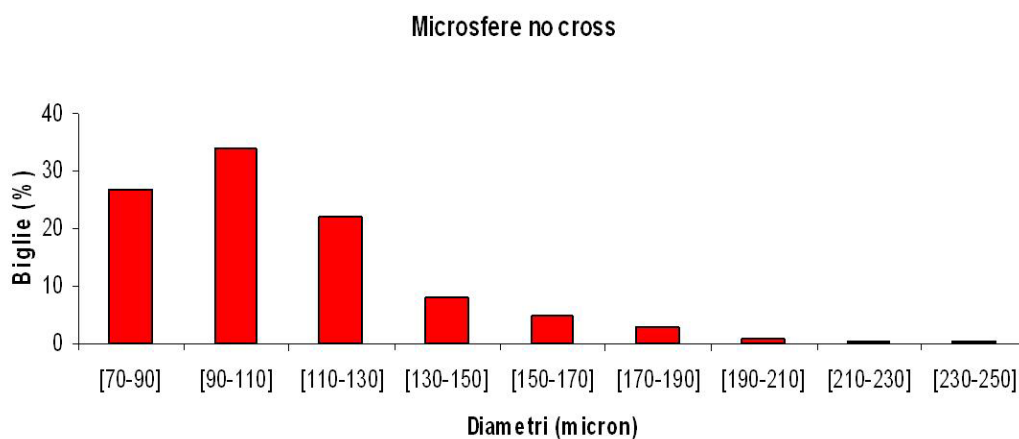


Fig. 17: Dimensioni microsfere non trattate

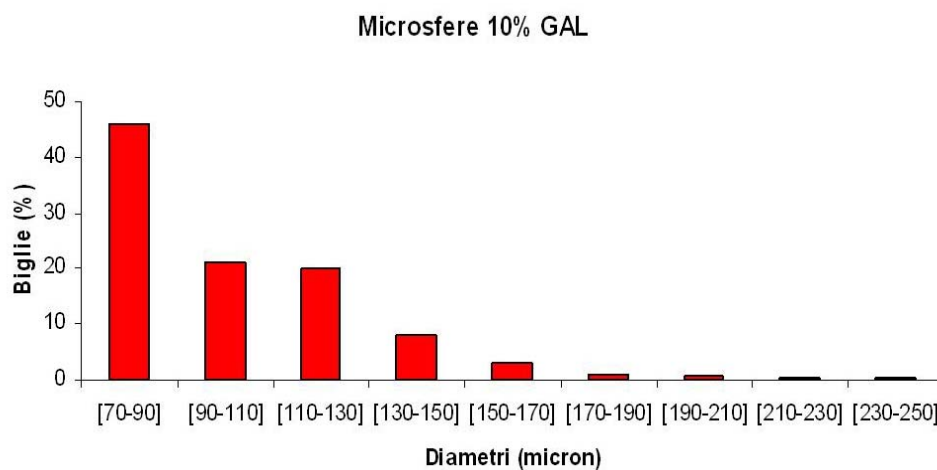


Fig. 18: Dimensioni microsfere trattate con il 10 % in peso di gliceraldeide rispetto alla gelatina

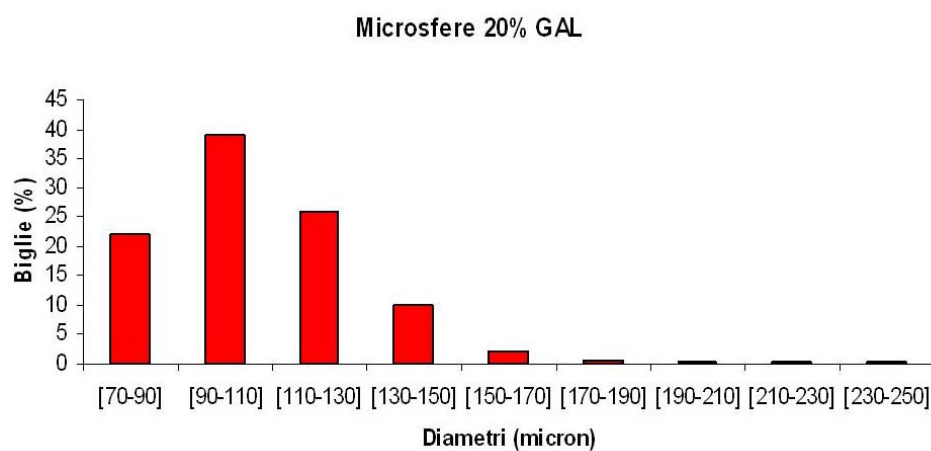


Fig. 19: Dimensioni microsfere trattate con il 20 % in peso di gliceraldeide rispetto alla gelatina

Dall'analisi effettuata è possibile osservare che le microsfere non trattate mostrano un diametro medio di circa $109 \pm 28 \mu\text{m}$ con range dimensionale variabile tra $70 \mu\text{m}$ e $250 \mu\text{m}$. Le microsfere in gelatina trattate con 10 % in peso di gliceraldeide hanno un diametro medio di circa $103 \pm 26 \mu\text{m}$ con range dimensionale variabile tra $71 \mu\text{m}$ e $228 \mu\text{m}$. Infine, le microsfere trattate con il 20 % in peso di gliceraldeide rispetto alla gelatina mostrano un diametro medio di circa $107 \pm 20 \mu\text{m}$ e range dimensionale variabile tra $79 \mu\text{m}$ e $181 \mu\text{m}$.

Da tale analisi è possibile concludere che le dimensioni delle microsfere non variano se sottoposte ad un trattamento di crosslinking ed al variare della percentuale di agente crosslinkante utilizzato.

3.1.3. Analisi termica

In Fig. 20 è riportato un tipico termogramma registrato per un campione di gelatina wet non crosslinkato, che esibisce un picco endotermico centrato a circa $102,28^\circ\text{C}$, associato alla transizione elica-coil della gelatina, con entalpia di denaturazione di circa $316,8 \text{ J/g}$. Il trattamento di crosslinking determina un aumento della stabilità termica della gelatina come dimostrato dalla variazione della temperatura di denaturazione verso valori più alti. Nel termogramma registrato per un campione di gelatina trattato con il 10 % in peso di gliceraldeide rispetto alla gelatina (Fig. 21), il picco endotermico è centrato a circa $106,18^\circ\text{C}$ e l'entalpia di denaturazione associata è circa $302,4 \text{ J/g}$. Infine, il termogramma registrato per un campione di gelatina crosslinkato con il 20 % in peso di gliceraldeide rispetto alla gelatina mostra un picco di denaturazione a circa $109,65^\circ\text{C}$ e l'entalpia di denaturazione associata è di circa $263,5 \text{ J/g}$ (Fig. 22).

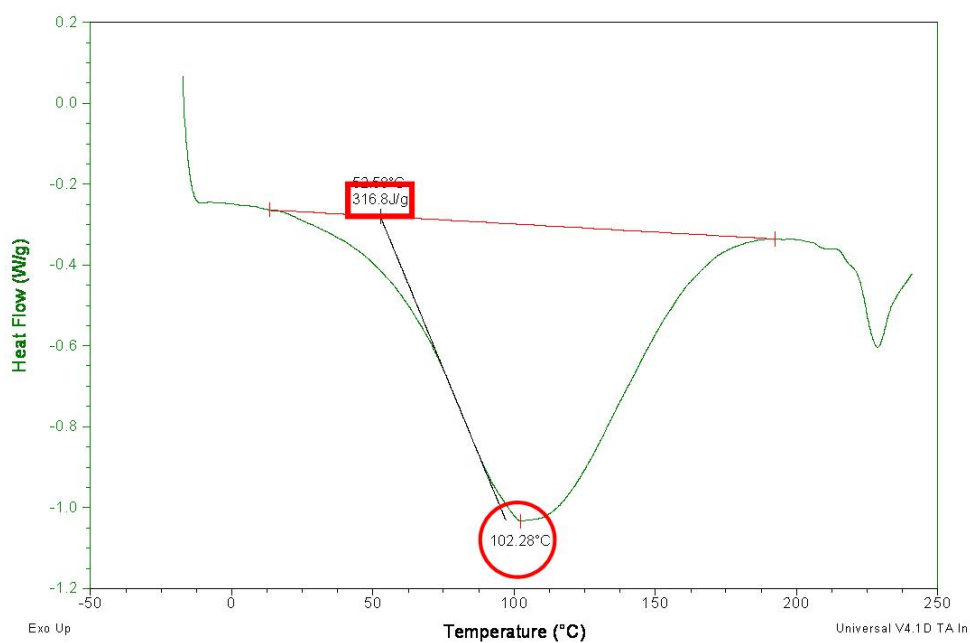


Fig. 20: Termogramma del campione di gelatina non trattato

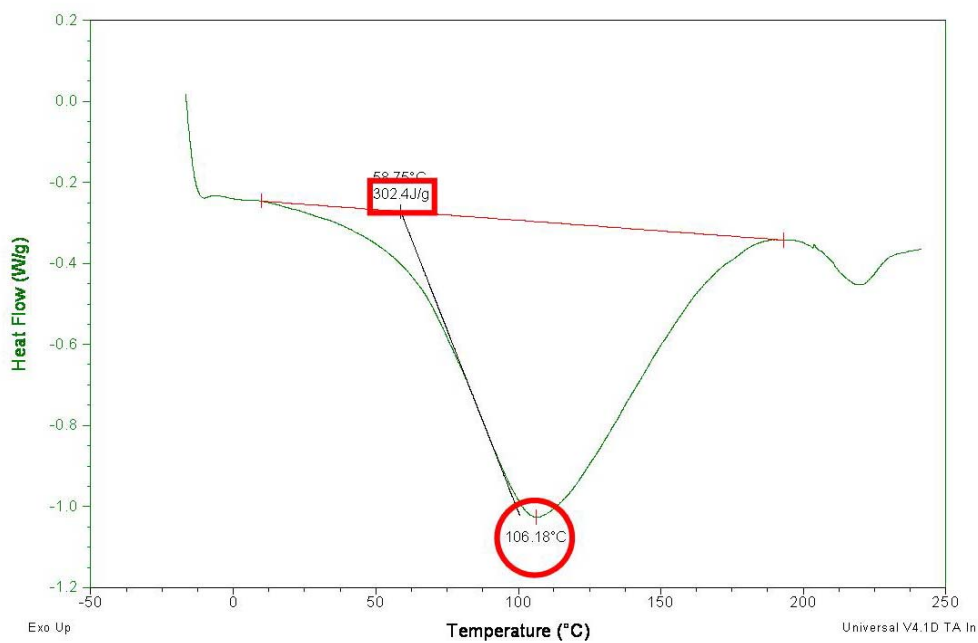


Fig. 21: Termogramma del campione trattato con il 10 % in peso di gliceraleide rispetto alla gelatina

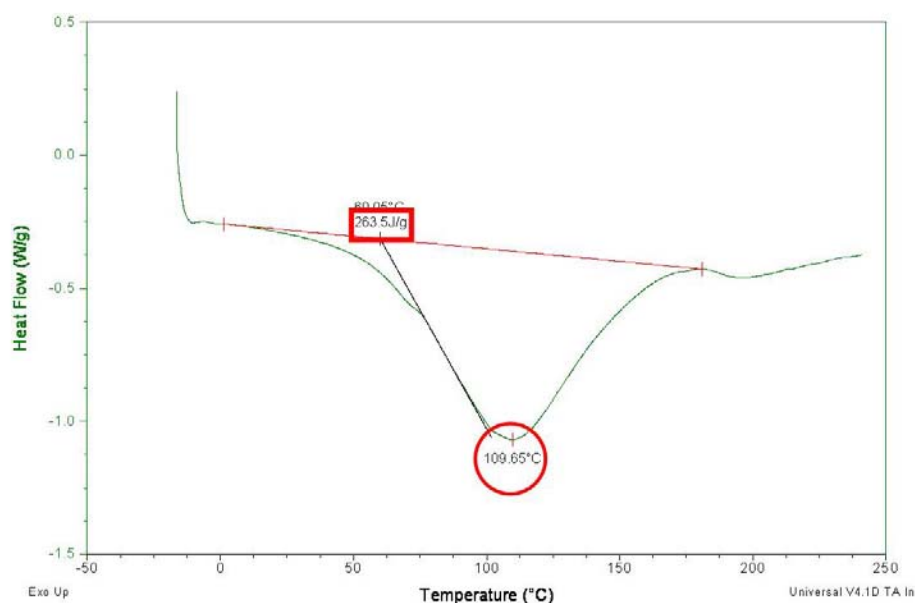


Fig. 22: Termogramma del campione trattato con il 20 % in peso di gliceraldeide rispetto alla gelatina

I valori della temperatura di denaturazione osservati per i campioni in condizioni wet aumentano all'aumentare della quantità di agente crosslinkante utilizzato, in relazione all'aumento dell'efficienza di crosslinking. E' abbastanza comune che nei termogrammi DSC dei materiali collaginei siano riportati processi endotermici legati alla rottura dei legami idrogeno ed al riarrangiamento della tripla elica in una conformazione random [113,114]. L'aumento della stabilità termica e la diminuzione del calore endotermico mostrato dal collagene in seguito ad air-drying, è stato attribuito, invece, alla presenza di legami covalenti, tipo crosslinks, che vengono rotti esotermicamente [115,116]. Allo stesso modo, l'aumento della stabilità termica del collagene dovuto all'*aging* è legato alla produzione di crosslink covalenti [117]. Inoltre, è stato precedentemente dimostrato che maggiormente è crosslinkato il materiale collageneo e minore sarà la sua capacità di assorbire acqua [118, 119]. Per questo motivo, la diminuzione osservata dei valori dell'entalpia di denaturazione all'aumentare della concentrazione di gliceraldeide può essere attribuita sia alla riduzione dei legami idrogeno, che vengono rotti endotermicamente, che al simultaneo aumento della quantità di crosslink covalenti, che vengono rotti esotermicamente. Tenendo in considerazione l'importanza dell'acqua associata alla proteina [119], il trattamento di crosslinking con la gliceraldeide influisce maggiormente sulla variazione dell'entalpia della gelatina in condizioni wet piuttosto che nello stato dry.

3.1.4. Analisi dell'efficienza del crosslink: FTIR

La gelatina si dissolve in acqua a temperatura compresa tra 40°C e 50°C e, in queste condizioni, la sua struttura è a conformazione casuale. Raffreddando la soluzione, le catene di gelatina sono sottoposte ad una transizione sol-gel che è correlata con un progressivo cambiamento nella conformazione ed è accompagnata dalla riformazione di legami idrogeno tra le catene [120]. Il numero e la natura dei legami a idrogeno ed i crosslink durante il fenomeno di gelazione sono responsabili della stabilità e delle proprietà fisiche della gelatina, quali la resistenza alla degradazione, la resistenza meccanica e l'idrofilicità. Il crosslinking della gelatina è possibile grazie alla presenza di alcuni gruppi laterali reattivi. Il modello della gelatina è in genere, $-(\text{Gly} - \text{X} - \text{Pro})_n$ - o $-(\text{Gly} - \text{X} - \text{Hypro})_n$ -, dove X è un qualsiasi amminoacido, Gly è la glicina, Pro è la prolina e Hypro è l'idrossiprolina (22%). Il gruppo amminico della lisina residua ($\text{R} = -(\text{CH}_2)_4\text{-NH}_2$, 33 % del totale) può reagire con il gruppo aldeide della gliceraldeide per formare dei crosslink tra le catene (Fig. 23).

La reazione di crosslink che ha luogo inizia con un attacco nucleofilo dell'azoto del gruppo amminico NH_2 della gelatina (in quanto l'azoto ha 2 elettroni liberi) sul carbonio carbonilico (doppio legame CO). L'ossigeno prende gli elettroni del doppio legame e si libera una molecola d'acqua. Si avrà uno spostamento del doppio legame da CN a CC dovuto ad una reazione di tautomerizzazione. Infine, si ha uno spostamento dell'idrogeno dell'ossidrile che va a legarsi con il carbonio e, quindi, uno spostamento del doppio legame da CC a CO. A questo punto si ha l'attacco nucleofilo dell'azoto di un'altra molecola di gelatina verso il carbonio carbonilico e la formazione del doppio legame NC. Quindi, in seguito alla reazione di crosslinking, il nuovo legame che si è formato è il doppio legame NC a scapito dei legami a idrogeno semplici NH.

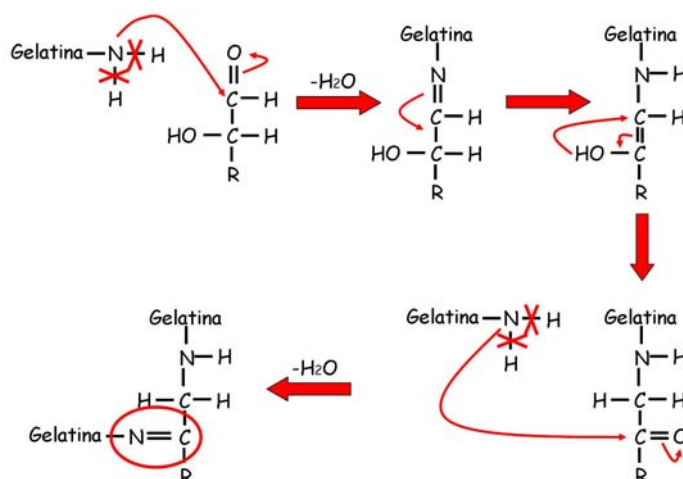


Fig. 23: Schema della reazione di crosslink tra gelatina e gliceraldeide.

La reazione tra la gelatina e la gliceraldeide è accompagnata da un cambiamento del colore dovuto alla presenza del linkage dell'aldimide in seguito alla reazione di crosslinking [121]. Per il sistema investigato, la concentrazione della gelatina è il 30 % in peso e sotto queste condizioni, le catene della proteina possono essere considerate legate. L'aumento della concentrazione della gelatina può portare ad un aumento dei punti di contatto tra le catene e, quindi, una maggiore possibilità di formare strutture ad elica.

In Fig. 24 sono riportati gli spettri IR delle microsfere in gelatina non crosslinkate, crosslinkate con il 10% e con il 20% di gliceraldeide. Si osserva che gli spettri IR delle microsfere non trattate e quelle trattate con il 10% di GAL non mostrano alcuna differenza significativa. Questo si spiega, come detto precedentemente, in quanto il 10% di gliceraldeide non è una concentrazione sufficiente a crosslinkare efficientemente le microsfere in gelatina.

Al contrario, lo spettro IR delle microsfere trattate con il 20% di GAL mostra diversi cambiamenti dei picchi; in particolare, si osserva:

- 1) uno spostamento del primo picco (1637cm^{-1}) verso valori più elevati di lunghezza d'onda, tra 1650 cm^{-1} e 1680 cm^{-1} , tipici dei movimenti di stretching del doppio legame NC;
- 2) una sovrapposizione del picco a 1508 cm^{-1} , caratteristico dei movimenti dei gruppi liberi delle proteine, con il picco a 1546 cm^{-1} , caratteristico dei movimenti di stretching del doppio legame NC;

- 3) un aumento di intensità del picco a 1450 cm^{-1} tipico dei movimenti di stretching del doppio legame NC;
- 4) una diminuzione del picco a 1030 cm^{-1} , caratteristico dei movimenti di stretching dei gruppi amminici della gelatina.

In conclusione, dai primi tre punti si evince un aumento sostanziale della presenza di doppi legami NC e, dall'ultimo punto, una riduzione dei gruppi amminici. Quindi, è stato possibile concludere che il 20% di gliceraldeide è la concentrazione ottimale per crosslinkare le microsfere in gelatina.

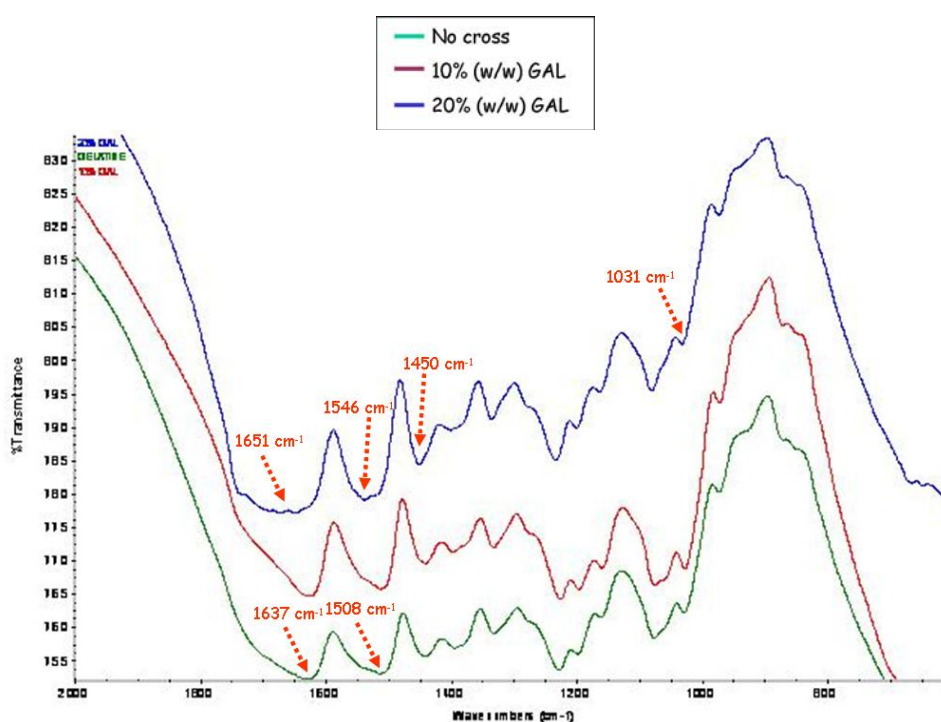


Fig. 24: Spettro IR microsfere gelatina.

3.1.5 Analisi proprietà di swelling delle microsfere

I grafici che rappresentano le proprietà di swelling delle microsfere (Fig. 25 e 26) mostrano che, per entrambe le tipologie di microsfere, lisce e porose, il volume di acqua assorbito aumenta monotonicamente fino a raggiungere il valore di swelling all'equilibrio. Come si può osservare da entrambi i grafici, la concentrazione di agente crosslinkante influisce notevolmente sulle proprietà di swelling delle microsfere. In particolare, all'aumentare della concentrazione di gliceraldeide (GAL) diminuisce la

capacità delle microsfere di assorbire acqua. Questa è un'ulteriore conferma dell'efficienza del crosslinking della gliceraldeide sulla gelatina.

Inoltre, si osserva anche che le microsfere porose in gelatina sono in grado di assorbire maggiori quantità di acqua in quanto la superficie esposta a contatto con l'acqua risulta essere maggiore rispetto alle microsfere lisce.

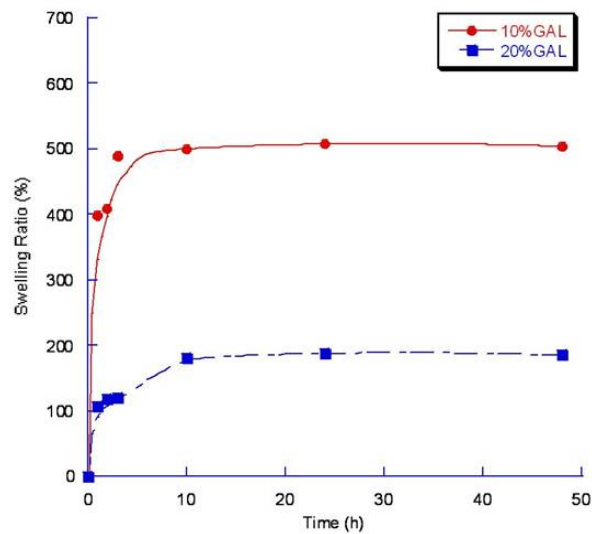


Fig. 25: Swelling microsfere lisce.

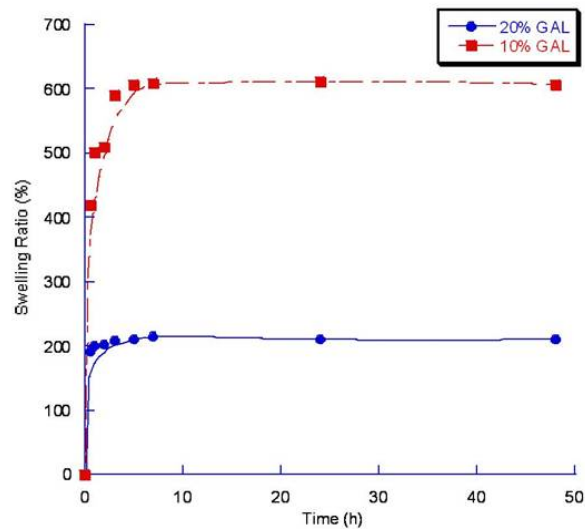


Fig. 26: Swelling microsfere porose.

3.1.6. Coltura fibroblasti - Test di citotossicità

Al fine di valutare la citotossicità della gliceraldeide utilizzata per crosslinkare le microsfere in gelatina, sono stati effettuati alcuni esperimenti preliminari di coltura cellulare con fibroblasti.

Si riportano di seguito le immagini al microscopio ottico relative ai primi esperimenti di coltura cellulare di fibroblasti effettuata sulle microsfere della tipologia G₂.

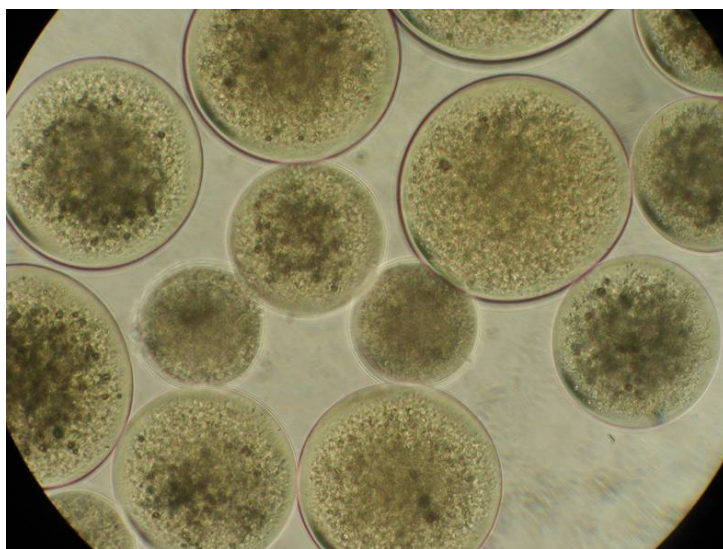


Fig. 27:
Tipologia G₂
senza cellule

Fig. 28:
Tipologia G₂
dopo 1
settimana

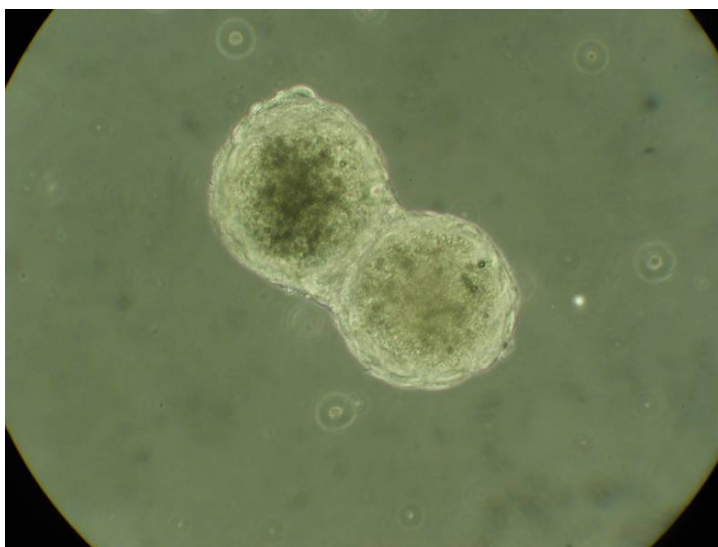




Fig. 29:
Tipologia G₂
dopo 2
settimane

Si riportano, inoltre, di seguito le micrografie SEM relative ai primi esperimenti di coltura cellulare effettuata sulle microsfele della tipologia G₂.

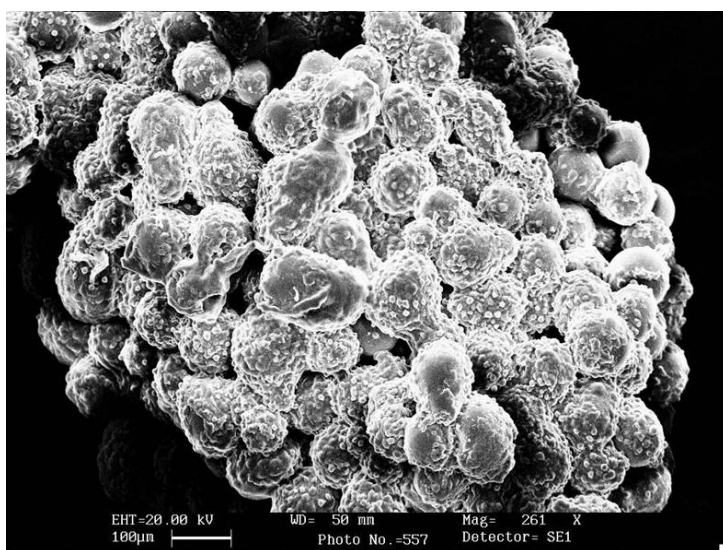


Fig. 30:
Tipologia G₂
261 x

Fig. 31:
Tipologia G₂
1.09 Kx

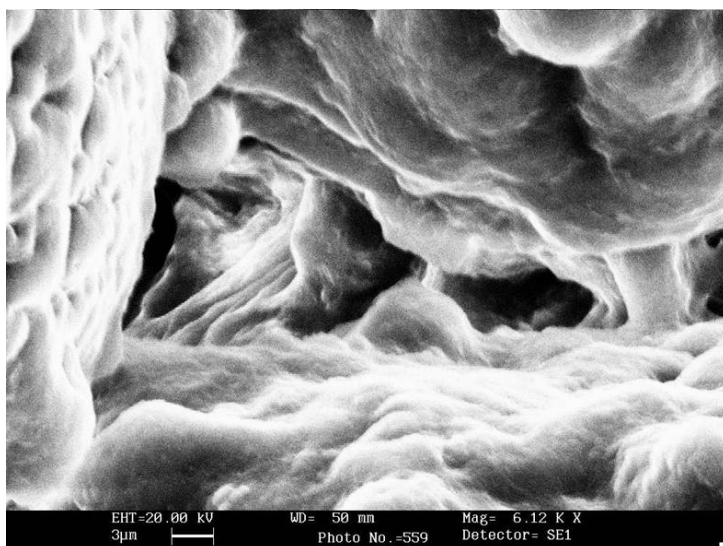
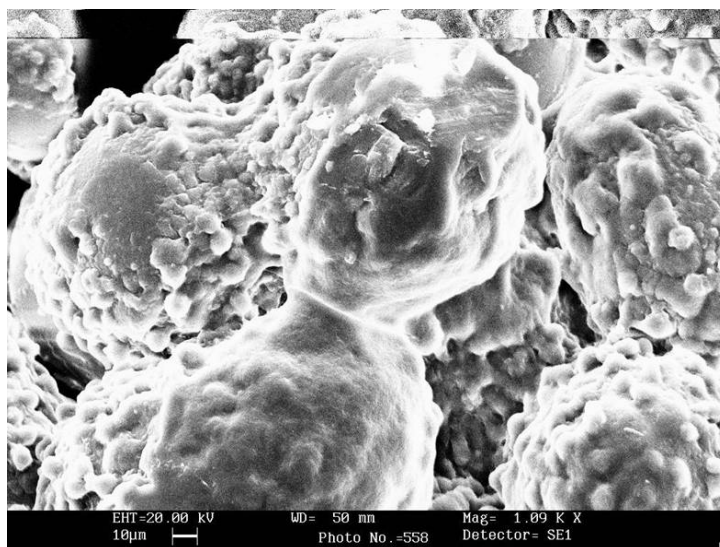


Fig. 32:
Tipologia G₂
6.12 Kx

Infine, sulla stessa tipologia di microsfeere, G₂, si riportano anche le analisi istologiche dopo una e due settimane di semina di fibroblasti in piastra basculante.

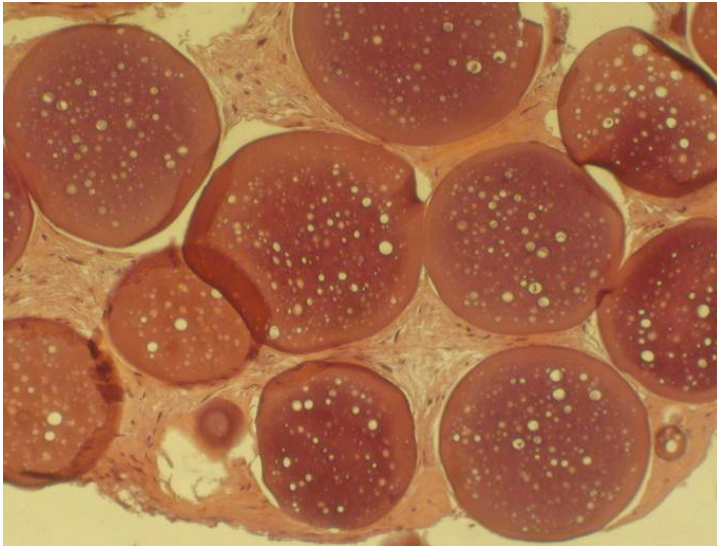
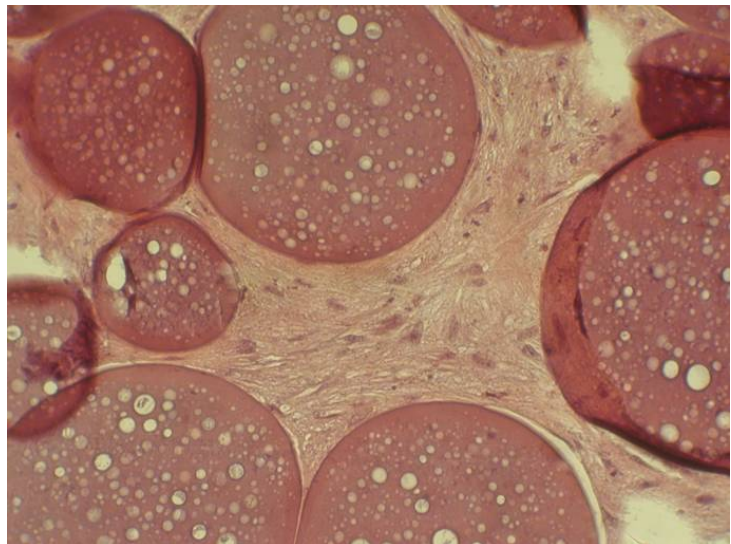


Fig.33:
Tipologia G₂
dopo 1
settimana

Fig. 34:
Tipologia G₂
dopo 2
settimane



Da tutte le immagini riportate, si osserva che le microsfele sono completamente ricoperte da monostrati cellulari e sono in grado di aderire tra loro in modo da formare una matrice tridimensionale. Inoltre, risulta particolarmente evidente la presenza di matrice extracellulare prodotta dalle cellule, tanto da non riuscire neanche più ad identificare la superficie delle microsfele. Da questi risultati risulta evidente, quindi, che la gliceraldeide è assolutamente non tossica in quanto la sua presenza come crosslinkante della gelatina non determina la necrosi dei fibroblasti né inibisce la produzione di matrice extracellulare da parte delle cellule seminate sulle microsfele.

3.1.7. Analisi del rilascio di IGF-1

Il profilo di rilascio del fattore di crescita IGF-1 dalle microsfere in gelatina crosslinkate con il 20 % di gliceraldeide è riportato in funzione del tempo in Fig 35. Sotto le condizioni utilizzate per lo studio *in vitro*, si osserva un profilo di rilascio bifasico. Vi è un breve periodo iniziale di rilascio rapido di IGF-1, *burst effect*, seguito da un rilascio più prolungato, durante il quale ha luogo un rilascio di IGF-1 più lento. In particolare, l'ammontare di IGF-1 rilasciato nelle prime 24 h è di circa 65 % ed è dovuto allo swelling delle microsfere una volta immerse nella soluzione fisiologica. Lo swelling delle microsfere comporta l'assorbimento di acqua all'interno di esse ed il conseguente rilascio dell'IGF-1 presente che non ha formato un complesso con le catene di gelatina.

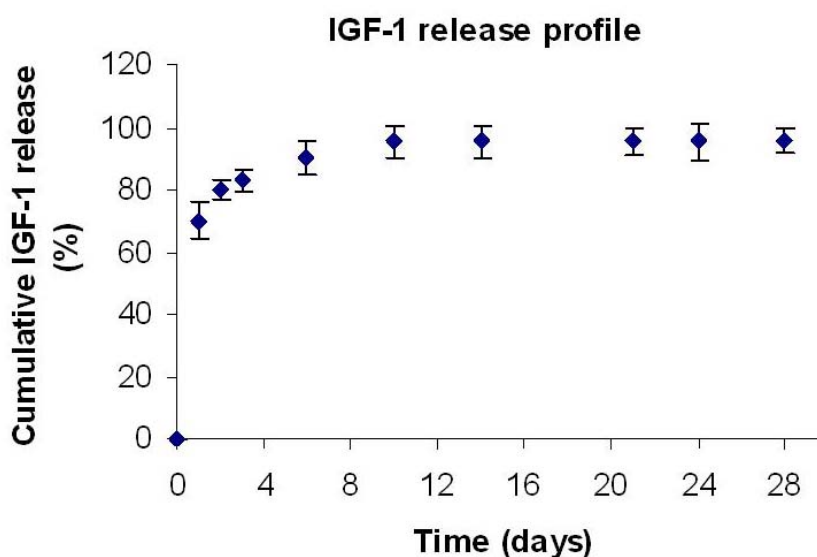


Fig. 35: Profilo di rilascio di IGF-1 dalle microsfere in gelatina

Nella seconda fase, praticamente tutto l'IGF-1 viene rilasciato dalle microsfere nell'arco di 28 giorni, dovuto alla conseguente degradazione delle microsfere in ambiente fisiologico e la rottura dei complessi formati tra le cariche negative della gelatina e quelle positive del fattore di crescita. In particolare, la gelatina utilizzata per realizzare le microsfere è la gelatina di tipo B, acida, con punto isoelettrico di circa 5, che presenta una maggiore quantità di gruppi carbossilici, COOH^- , e, quindi, una maggiore carica negativa. L'IGF-1, invece, ha carica leggermente positiva (punto isoelettrico è circa 7.5 in soluzione fisiologica), per tale motivo l'IGF-1 viene caricato all'interno delle

microsfere mediante una complessazione polianionica in soluzione acquosa. L'interazione della proteina con la gelatina risulta quindi nell'assorbimento della proteina da parte dell'idrogel di gelatina. Dato che la gelatina viene principalmente degradata dalla digestione enzimatica, i fattori di crescita che effettivamente formano dei complessi o si legano alle microparticelle mostrano, in genere, dei profili di rilascio in soluzione fisiologica con due fasi prominenti [122]. La prima fase riguarda il rilascio delle molecole del fattore di crescita che non hanno formato alcun complesso o sono debolmente legati alla gelatina nelle prime 24 h durante il raggiungimento del valore di swelling di equilibrio. La seconda fase riguarda il rilascio delle molecole del fattore di crescita che hanno formato dei complessi con la gelatina durante il restante periodo di tempo di circa un mese dovuto, invece, alla degradazione enzimatica delle microsfere in gelatina. Tale caratteristica della gelatina di formare complessi polianionici con le proteine, la rende il materiale ideale per la realizzazione di sistemi di rilascio controllato per fattori di crescita.

3.2 Doppia Emulsione

Le microsfere in gelatina porose sono state realizzate mediante una pseudo doppia emulsione come illustrato nel paragrafo 3.2.2. del capitolo 3, Materiali e Metodi.

3.2.1 Analisi morfologica

Si riportano di seguito le micrografie delle microsfere ottenute mediante pseudo doppia emulsione ottenute mediante microscopio a scansione elettronica SEM.

Nello specifico, sono state riportate solo le micrografie delle microsfere ottimali ottenute mediante la tecnologia della doppia emulsione.

Fig. 36:
1.48 Kx

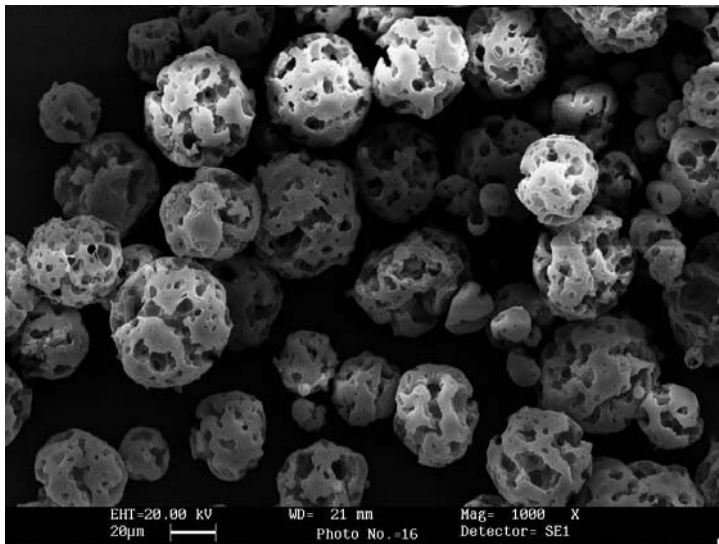
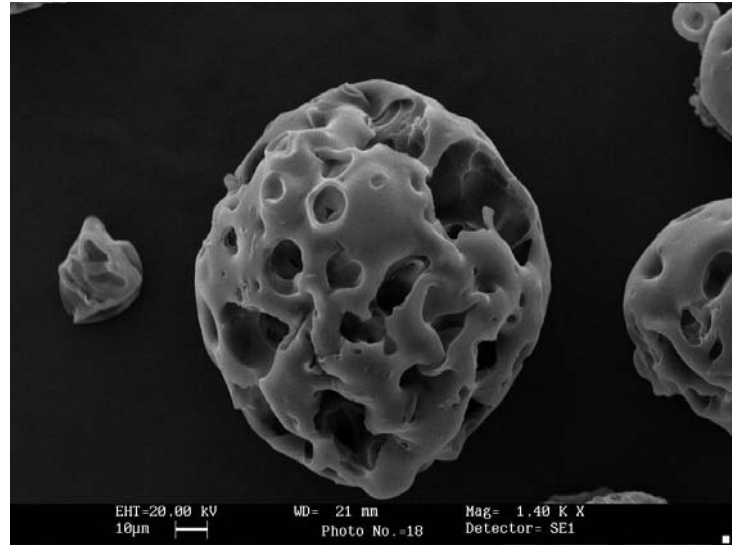


Fig. 37:
1000 x

Dalle micrografie riportate si osserva una superficie delle microsfele porosa con diametro medio dei pori di circa $20\ \mu\text{m}$. Inoltre, i pori, interni ed esterni, mostrano un elevato grado di interconnessione. La dimensione delle microsfele è variabile tra $75\ \mu\text{m}$ e $150\ \mu\text{m}$.

Tale dimensione delle microsfele e dei pori che le caratterizzano sono i parametri ottimali per la nostra applicazione d'interesse, ossia la semina delle cellule staminali mesenchimali e la loro successiva iniezione nel miocardio mediante siringa con ago 27 Gauge. La dimensione di $75\text{-}150\ \mu\text{m}$ delle microsfele ne permette la somministrazione mediante tale ago e la dimensione dei pori di circa $20\ \mu\text{m}$ permette la migrazione delle

cellule staminali all'interno di essi, in quanto tali cellule sono caratterizzate da un diametro di circa 10-15 μm .

3.2.2. Coltura cellulare di MSC

Le cellule mesenchimali umane del midollo osseo (hMSC) sono state coltivate con le microsfere in gelatina porose in spinner flask mediante coltura intermittente per permettere una migliore distribuzione cellule-biglie.

Le prime ore di contatto tra le cellule ed il materiale sono le più critiche, dal momento che è noto che, per le cellule ad ancoraggio dipendente, l'adesione al substrato deve avvenire in poche ore altrimenti le cellule perdono la loro vitalità. Pertanto, durante le prime sei ore di coltura sono stati effettuati prelievi dalle spinner flask per valutare la scomparsa delle cellule libere dalla sospensione, che fornisce una prima indicazione di quante cellule hanno aderito alle microbiglie.

Dal grafico seguente (Fig. 38) si può osservare che dopo 5h di coltura più del 90 % delle cellule ha aderito alle biglie.

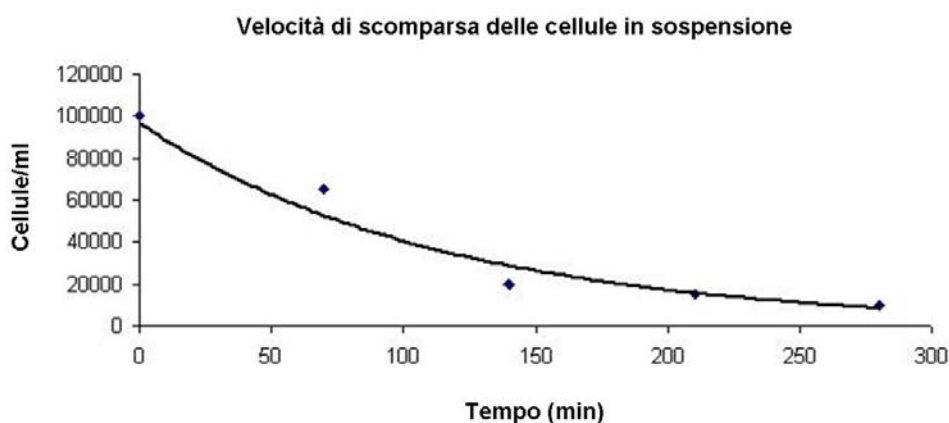


Fig. 38: Velocità di scomparsa delle MSC dal mezzo in sospensione

Inoltre, le microbiglie prelevate dalle spinner flask sono contate con un'apposita griglia e trattate con tripsina al fine di staccare le cellule dalle microbiglie e poter così contare le cellule adese per microbiglia. Dal grafico seguente (Fig. 39) risulta che al quarto giorno di coltura nelle spinner flask ci sono circa 50 cellule per biglia e al settimo giorno di coltura ci sono più di 60 cellule per biglia.

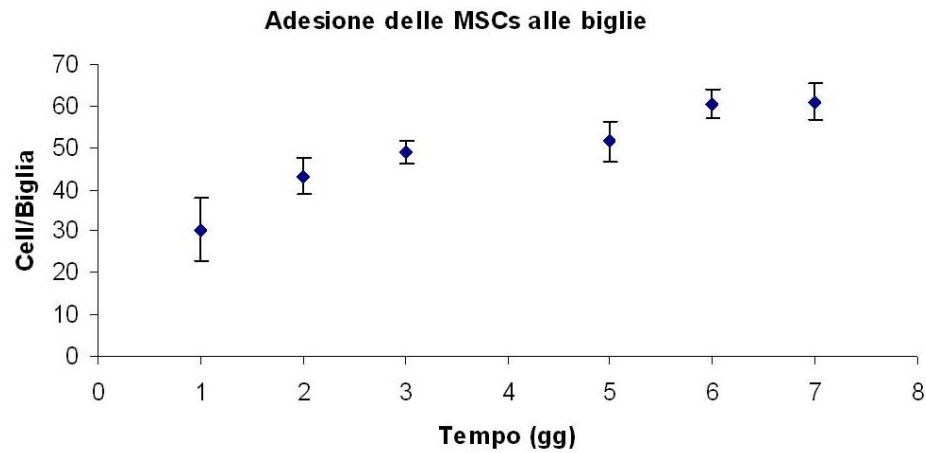


Fig. 39: Numero di cellule adese per microbiglia durante 7 giorni di semina nelle spinner flask

Sulle microbiglie prelevate è stato effettuato un test di vitalità cellulare con MTT (Fig. 40-42), che fornisce un risultato qualitativo della colonizzazione delle microbiglie da parte delle cellule mesenchimali staminali. Dalle immagini è possibile osservare che le cellule sono distribuite uniformemente sulle biglie e che all'aumentare del tempo di coltura aumenta il numero di cellule che aderiscono alle biglie.

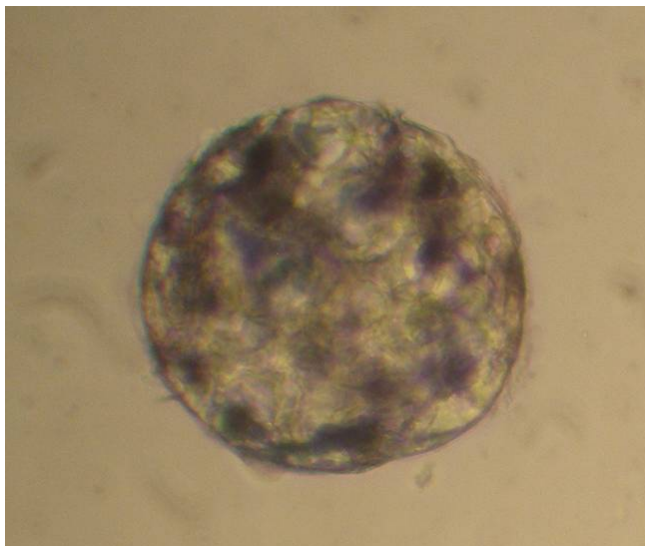


Fig. 40:
MTT dopo
24h

Fig. 41:
MTT dopo
48h

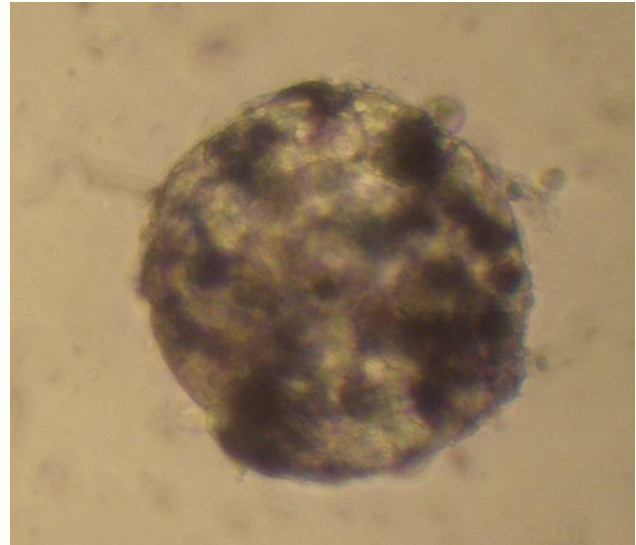


Fig. 42:
MTT dopo
3g

La colorazione con MTT è utile perché fornisce un riscontro immediato, sia pur qualitativo, della vitalità delle cellule e della loro adesione alle biglie. Come si può osservare dalle immagini (Fig.40-42) già dopo 24 h le cellule aderiscono alle biglie e la colorazione, proporzionale al numero di cellule adese, incrementa nel tempo. Inoltre, dalla figura 42 si evince che le cellule dopo 3gg di semina cambiano la loro morfologia, non più arrotondata ma risultano appiattite ed allungate, in quanto hanno completamente aderito alla superficie delle microsfele.

Di seguito sono riportate le immagini ESEM di una microsfera tal quale (Fig. 43), dopo 24 h (Fig. 44) e 3 giorni (Fig. 45) di coltura con hMSCs. Risulta particolarmente

evidente che le cellule hanno completamente aderito alla superficie delle microsfere creando dei monolayer cellulari. Infatti, nell'immagine di Fig. 44 si osserva che le cellule hanno aderito molto bene alla microsfera rendendo difficile osservare la superficie porosa della microsfera stessa in quanto completamente ricoperta da materiale cellulare. Infine, dalla immagine di Fig. 45, si osserva che per tempi di coltura maggiori, le microsfere ricoperte di cellule e materiale cellulare, aderiscono tra loro formando costrutti tridimensionali.

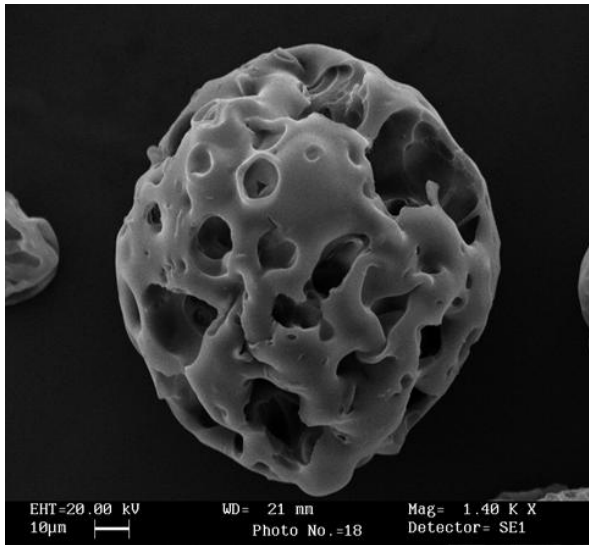
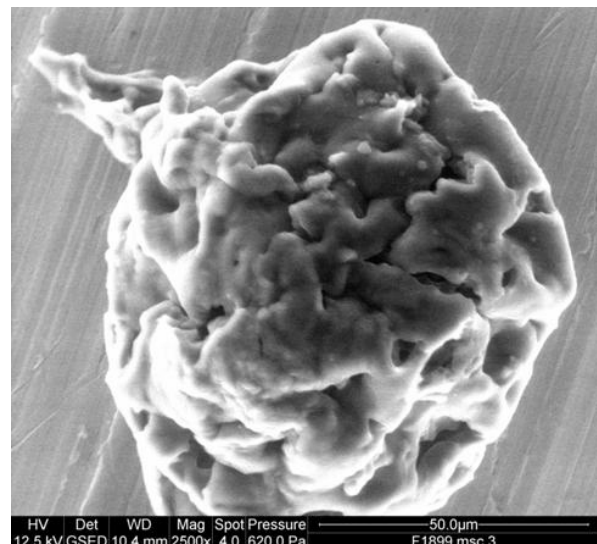


Fig. 43:
microsfera
tal quale

Fig. 44:
microsfera dopo
24h semina con
MSCs



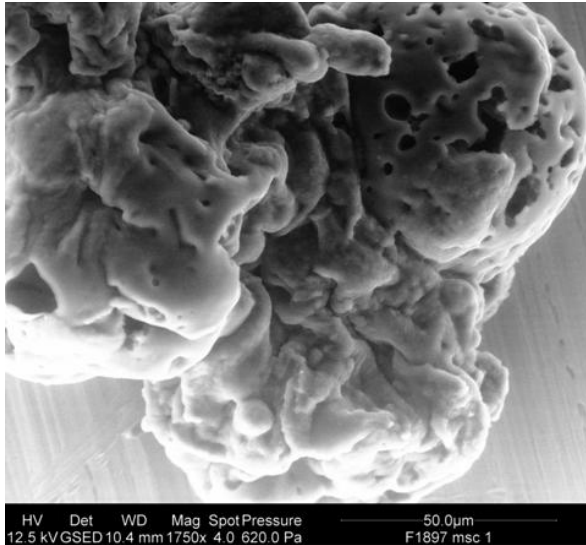


Fig. 45:
microsfere dopo
3g semina con
MSCs

Inoltre, le microsfele con le cellule staminali mesenchimali dopo 3 giorni di coltura sono state osservate anche mediante microscopio confocale a scansione laser. In particolare, dall'immagine al microscopio confocale si può osservare la presenza di cellule vitali sulla superficie e nelle cavità interne delle microsfele. E' stato possibile osservare che le cellule sono in grado di crescere sulle microsfele e di formare dei ponti tra di esse (Fig. 46).

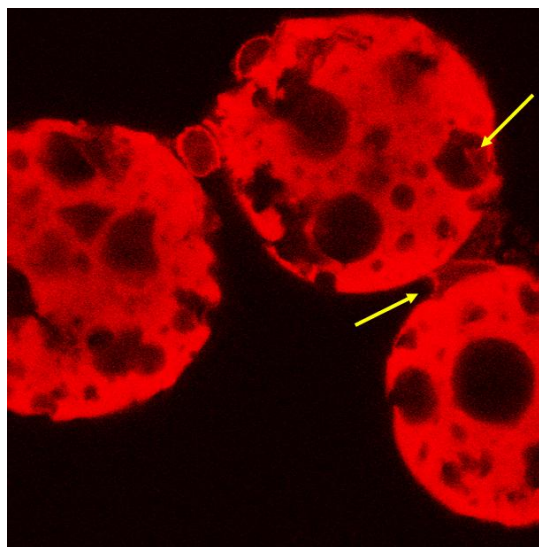
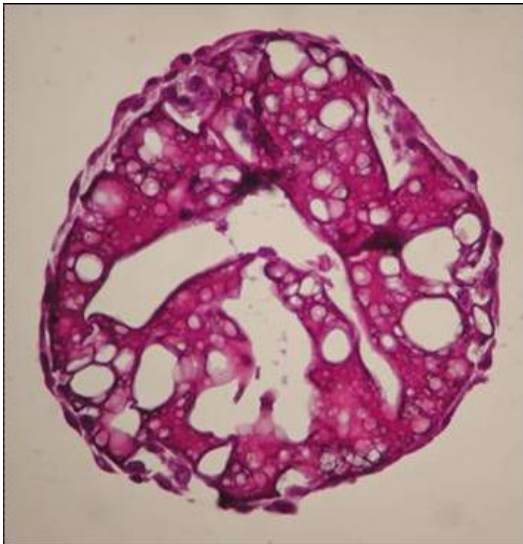


Fig. 46: Immagine LCSM microsfele dopo 3gg di coltura con hMSCs.

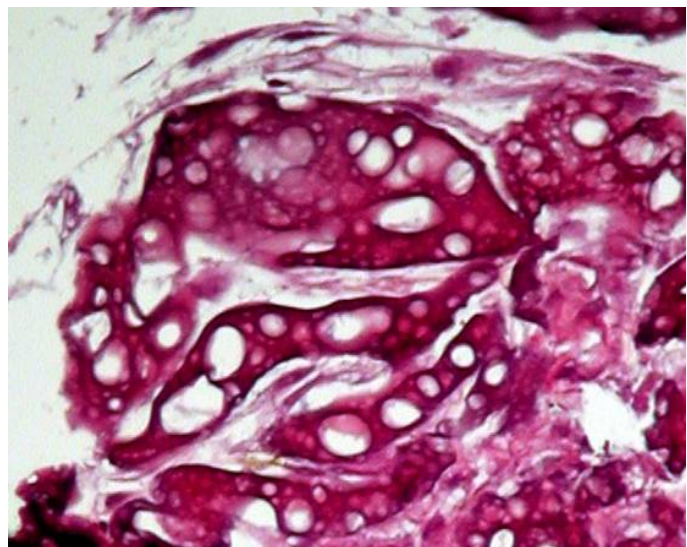
Sui campioni prelevati dalle spinner flask sono state effettuate anche analisi istologiche con colorazione ematossilina-eosina a diversi intervalli di tempo (Fig. 47 e 48).

Tale analisi istologica conferma ulteriormente quanto detto. Le cellule hanno aderito alla superficie delle microsfere e alle loro cavità superficiali formando dei monostrati cellulari. Inoltre, si può osservare come le cellule siano in grado di penetrare all'interno delle microsfere attraverso le loro cavità e di produrre materiale cellulare, favorendo così l'adesione tra le biglie e la formazione di sistemi tridimensionali.



**Fig. 47: istologia
microsfere dopo
24h semina con
MSCs**

**Fig. 48: istologia
microsfere dopo
3g semina con
MSCs**



3.3 *Impianto in vivo*

I dati preliminari *in vivo* del presente studio supportano un ruolo protettivo da parte dell'IGF-1 nel processo di rimodellamento del miocardio in seguito ad infarto cardiaco. La somministrazione di IGF-1, praticata con una tecnica innovativa di rilascio graduale e sostenuto *in situ*, ha determinato una riduzione della percentuale di tessuto infartuato e un generale aumento della densità capillare. L'uso di gelatina biodegradabile ha consentito il rilascio *in vivo* di IGF-1 per un prolungato periodo temporale. Gli animali così trattati non hanno subito i tipici effetti collaterali di una terapia con IGF-1 ad alte dosi quali ipoglicemia, ipertrofia miocardica e in tempi lunghi, crescita tumorale. Inoltre, è stato evidenziato il ruolo dell'IGF-1 sia nella deposizione della matrice extracellulare che nell'angiogenesi.

In questo studio, risulta evidente un coinvolgimento dell'IGF-1 nel mantenimento della vascolarizzazione del tessuto miocardico e nel controllo dei processi apoptotici.

Conta sfere inoculate

Gli animali trattati con inoculazione intracardiaca di microsfele, hanno ricevuto in media un totale di 10,000 sfere.

In particolare, gli esperimenti hanno evidenziato che, in media, è possibile inoculare con successo nella parete del miocardio il 95% di microsfele rispetto alla soluzione madre. Dalle analisi istologiche con ematossilina/cosina riportate in figura 49 è possibile osservare la presenza delle microsfele inoculate con successo nel tessuto cardiaco ad una settimana dall'impianto.

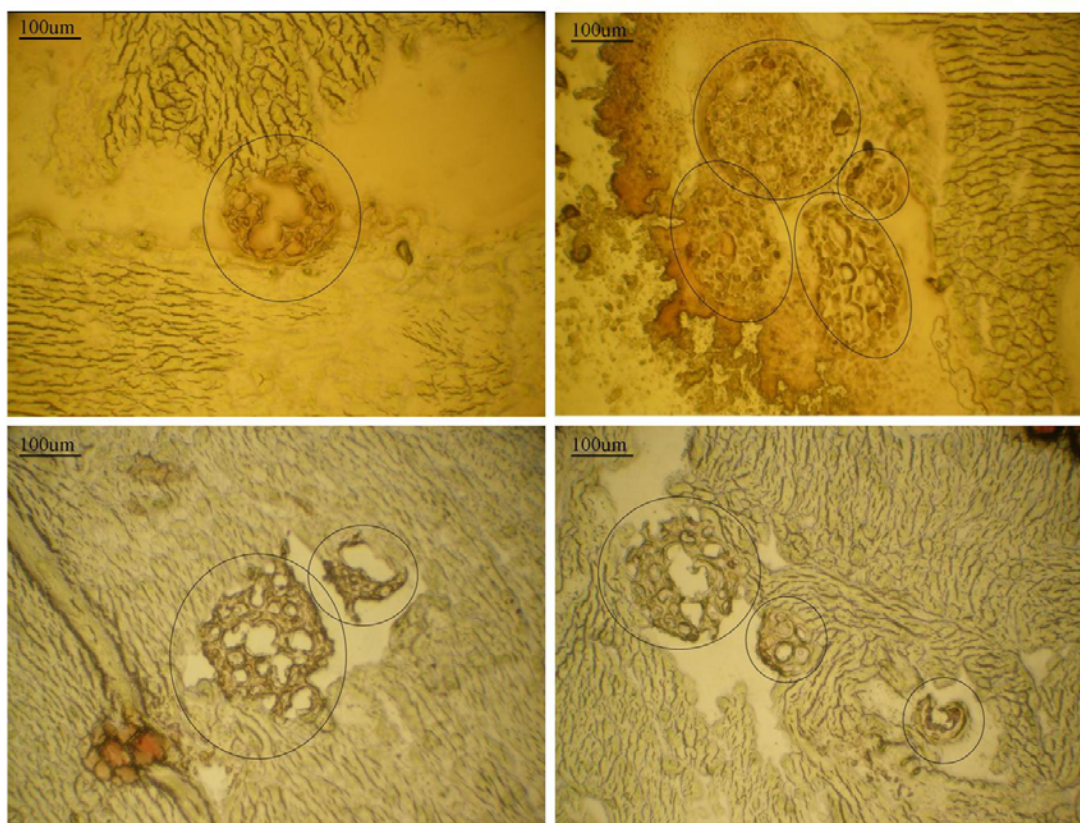


Fig. 49: sezione trasversa di miocardio in cui è possibile osservare la localizzazione in parete di microsferi preventivamente colorate con Rosso di sirio e appena iniettate (10 X).

E' stata, inoltre, effettuata una conta delle microsferi rimaste nelle siringhe dopo l'iniezione nel miocardio dei ratti, per calcolare quante microsferi sono state effettivamente iniettate. In 9 ratti, sono stati iniettati 100 ml di soluzione a concentrazione di 20 mg/ml; quindi, le microsferi iniettate sono in un range tra $6900 \div 13100$. Nell'istogramma seguente (Fig. 50) è riportato il numero di microsferi porose nude che sono state effettivamente iniettate.

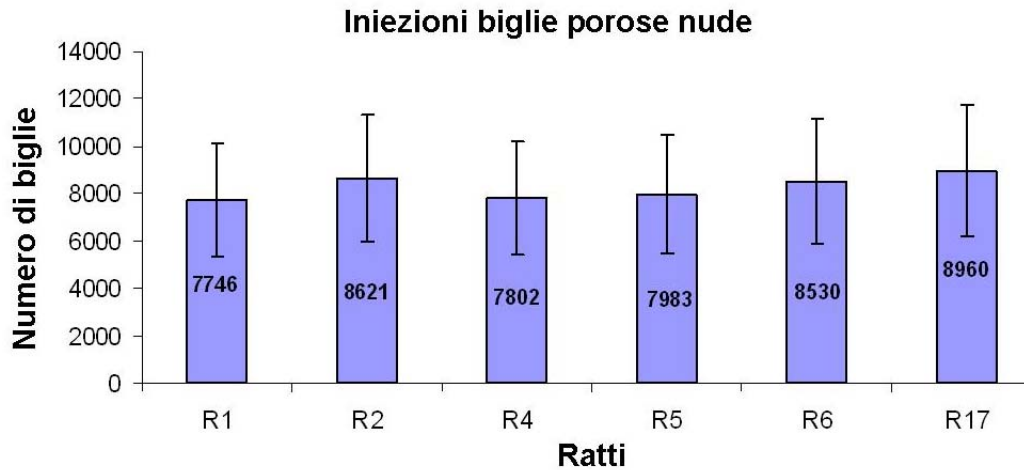


Fig. 50: numero di biglie porose nude in gelatina che effettivamente sono state iniettate all'interno del miocardio dei ratti

Per quanto concerne le microsfere lisce con IGF-1, le microsfere rimaste all'interno delle siringhe dopo l'iniezione risultano in quantità non significativa e, quindi, non è stata effettuata alcuna conta.

Dimensione dei cardiomiociti

L'analisi morfometrica condotta nei 2 gruppi di animali, ha evidenziato che il trattamento di microsfere caricate con IGF-1, dopo una settimana, ha influenzato il diametro dei cardiomiociti. In particolare quello relativo al gruppo 1 (ratti trattati con microsfere nude) è risultato essere di $15,30 \pm 3,5 \mu\text{m}$ mentre quello del gruppo 2 (ratti trattati con microsfere e IGF-1) è pari a $19,46 \pm 3,37 \mu\text{m}$. Tale differenza, analizzata con il T test, è risultata essere significativa ($P < 0,01$) (Fig. 51).

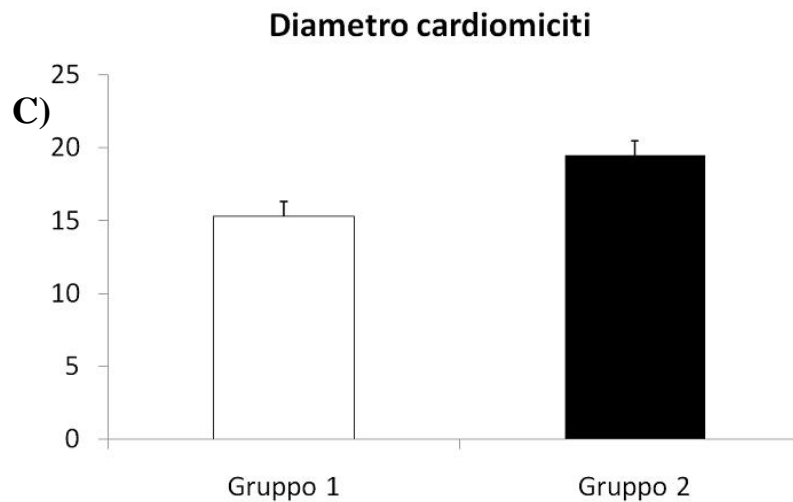
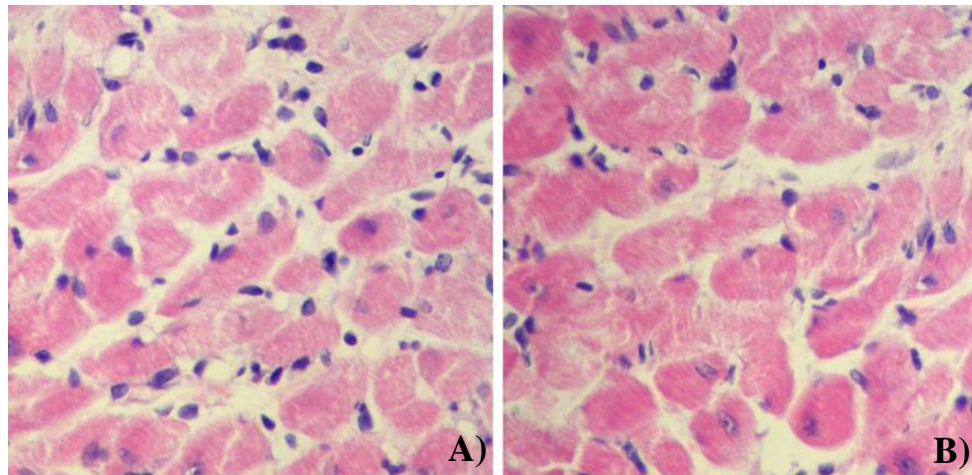


Fig. 51: Diametro dei cardiomiociti. Cardiomiociti rappresentativi degli animali appartenenti al gruppo 1 (microsfere nude, **A**) e al gruppo 2 (microsfere con IGF, **B**). Da notare il maggiore diametro dei cardiomiociti rappresentati in **B** (20 X, colorazione ematossilina eosina). **C:** valori numerici del diametro dei cardiomiociti rappresentati graficamente (* = $P < 0,05$)

Percentuale di infarto del miocardio

La percentuale di infarto ottenuta nei 2 gruppi è stata, rispettivamente di $30 \pm 19\%$ (gruppo 1) e di $28,5 \pm 17\%$ (gruppo 2) (Fig. 52). Pertanto è possibile stimare che sia stata ottenuta un'omogenea ampiezza dell'infarto in entrambi i gruppi.

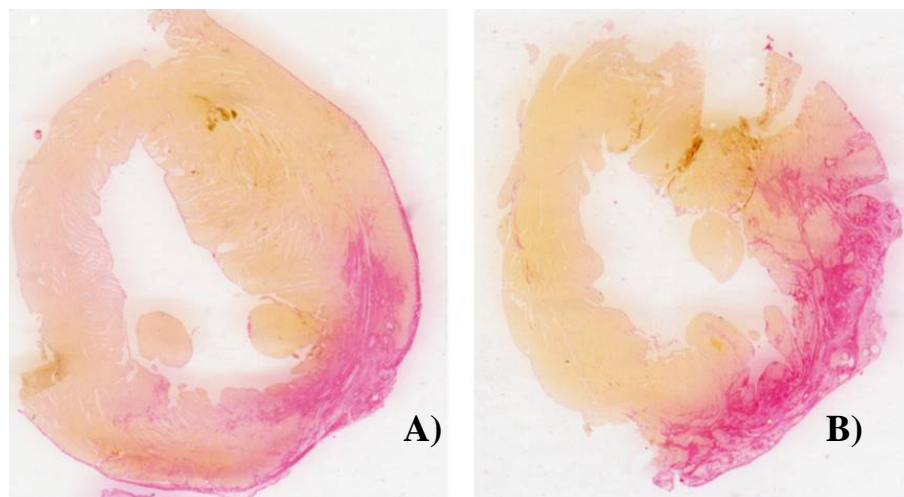


Fig. 52: Percentuale di infarto del miocardio. In **A** è raffigurata la % d'infarto relativa al gruppo 1 (microsfere nude) e in **B** quella relativa al gruppo 2 (microsfere con IGF-1). E' possibile notare in rosa intenso le fibre di collagene che costituiscono la cicatrice infartuale (2 X , colorazione picrosirius red).

Densità capillare

La densità capillare è stata calcolata come il numero medio di vasi capillari presenti per millimetro quadrato.

La densità capillare media, nel tessuto nell'area lontana dalla zona infartuale, è risultata essere di $4,682 \pm 900$ capillari/mm² nel gruppo 1 e di $4,609 \pm 874$ capillari/mm² nel gruppo 2 ($P = 0,19$). Quindi, non è stata osservata alcuna differenza significativa tra i due gruppi in tale zona.

Un'analisi dettagliata della zona di confine tra tessuto sano e cicatrice (zona perinfartuale) e all'interno della cicatrice stessa, ha rivelato delle differenze statisticamente significative della densità capillare in queste aree. In particolare, per il gruppo 1, nella zona perinfartuale si hanno $3,496 \pm 752$ capillari/mm² mentre nella cicatrice 476 ± 124 capillari/mm²; per il gruppo 2, nella zona perinfartuale si hanno $4,300 \pm 678$ capillari/mm² mentre nella cicatrice $1,748 \pm 329$ capillari/mm². Le comparazioni statistiche significative sono indicate in tabella e nella figura seguente (Tab.1 e Fig. 53).

	Area remota	Area perinfartuale	Area infartuale
gruppo microsfere vuote	4682 ± 900	3496 ± 752	476 ± 124
gruppo microsfere contenenti IGF-1	4609 ± 874	4300 ± 678 *	1748 ± 329 *

Tab.1 : densità capillare nel miocardio ventricolare post-infartuale. (* t test vs gruppo 1 P < 0,05)

Dai risultati riportati, quindi, si evince che la somministrazione di IGF-1, praticata con una tecnica innovativa di rilascio graduale e sostenuto in *situ*, ha determinato un generale aumento della densità capillare. Tale aumento risulta interessante particolarmente evidente nella zona limitrofa ai contorni della cicatrice infartuale, dove è presente un aumento della densità capillare di circa il 30%, e nella stessa area cicatriziale dove la densità capillare risulta triplicata rispetto al gruppo di ratti trattato con microsfere vuote.

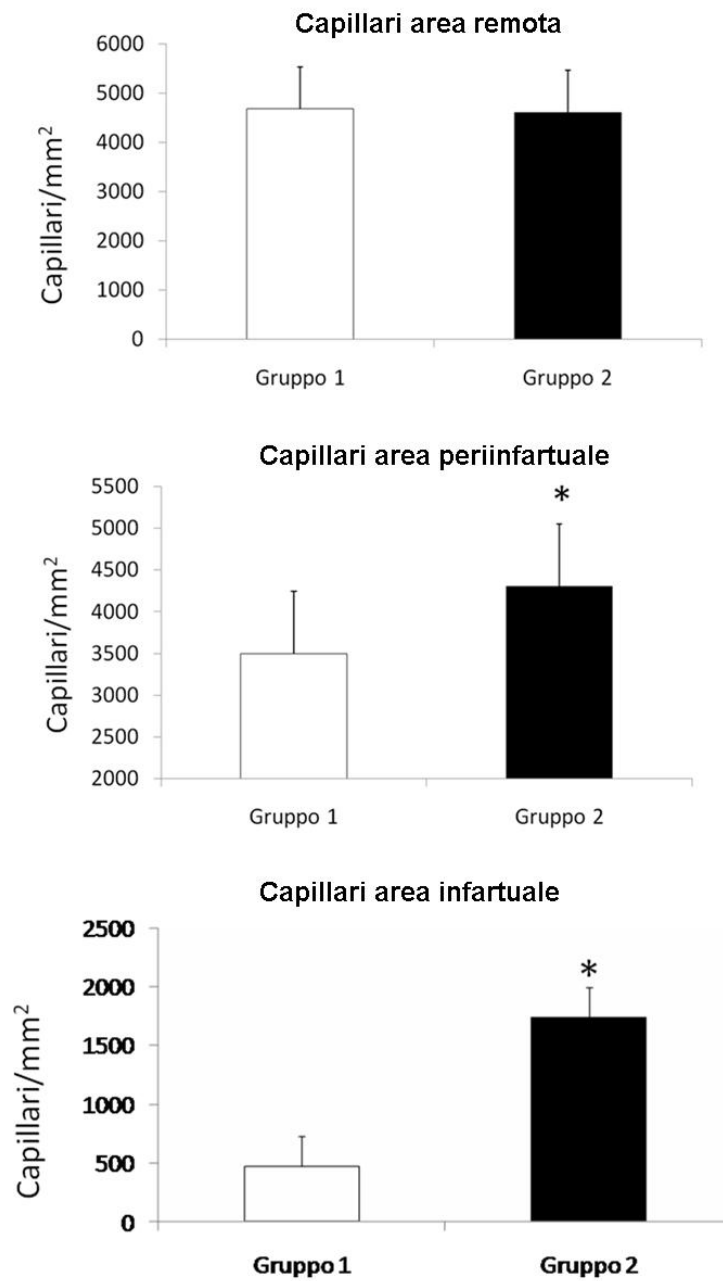


Fig. 53: Valori numerici della densità capillare nelle aree prese in esame.
(* = $P < 0,05$)

Apoptosi

Nelle aree cicatriziali di transizione, cioè in quelle più vicine alla zona confinante con il tessuto sano, in cui si è verificata una quasi totale perdita cellulare, la reazione per

annessina V ha evidenziato un cospicuo numero di cellule apoptotiche negli animali infartuati e trattati con microsfere nude (Fig. 54A).

Negli animali trattati con microsfere caricate con IGF-1, nella stessa zona si osserva che le figure apoptotiche sono piuttosto rare o assenti (Fig. 54B). Appare anche abbastanza evidente che, in queste aree, i cardiomiociti sono praticamente assenti negli animali non trattati (Fig. 54C), mentre in quelli trattati con IGF-1, sono presenti alcuni cardiomiociti, sia isolati che organizzati in veri e propri “cluster” di tessuto (Fig. 54D). Quindi, tale analisi dimostra che le microsfere caricate con IGF-1 sono in grado di proteggere i cardiomiociti ischemici da morte apoptotica almeno fino ad una settimana dopo l’impianto. Considerando che la vita media dell’IGF-1 è di circa 4 h, questo risultato suggerisce che l’effetto antiapoptotico dell’IGF-1 è sostenuto dalla gelatina. Tali risultati supportano l’ipotesi che un’iniezione di microsfere di gelatina caricate con IGF-1 migliora la funzione cardiaca nei ratti con infarto miocardico a differenza di un’iniezione di IGF-1 in forma libera (non incapsulato all’interno delle microsfere).

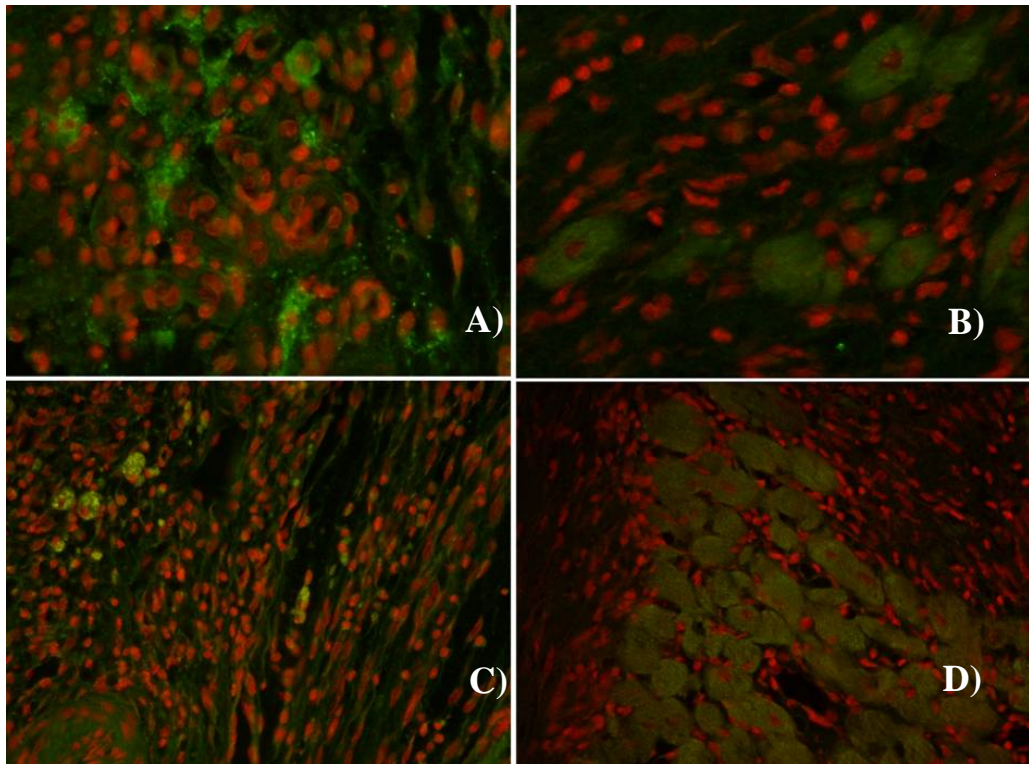


Fig. 54: Cardiomiociti apoptotici evidenziati con reazione per annessina V. In **A**, particolare della cicatrice infartuale di ratto gruppo 1, notare numerose figure apoptotiche, che risultano assenti negli animali trattati con IGF (**B**). Nei pannelli inferiori è illustrata la struttura della cicatrice, notare le numerose figure apoptotiche in **C** (gruppo 1, biglie nude) e, invece, la presenza di numerosi cardiomiociti che popolano la

scar degli animali trattati con IGF (**D**). (A e B 20 X ; C e D 10 X , nuclei marcati con ioduro di propidio, cellule apoptotiche marcate con anti-fosfatidilserina-fluorescina)

In questo studio, quindi, si è osservato che l'iniezione intramiocardica di microsfere di gelatina caricate con IGF-1 migliora significativamente la funzione cardiaca, proteggendo i cardiomiociti dalla morte apoptotica per un periodo di tempo prolungato e migliora la proliferazione dei cardiomiociti nell'area perinfartuale determinando una diminuzione della dimensione dell'infarto ed un aumento della densità capillare nel miocardio. Per tale motivo, sarà interessante studiare il rilascio combinato di IGF-1 e delle cellule staminali mediato dalle microsfere di gelatina in modo da attivare le cellule staminali per rigenerare il miocardio infartuato.

Capitolo 4

Conclusioni

Lo scopo del presente lavoro di Dottorato di Ricerca è stato di sviluppare una terapia innovativa per rigenerare e/o riparare i tessuti cardiaci in seguito ad un infarto acuto del miocardio. In particolare, la strategia proposta consiste nel somministrare nel miocardio infartuato contemporaneamente microsfere in gelatina contenenti il fattore di crescita IGF-1 e microsfere in gelatina seminate con cellule mesenchimali staminali, al fine di promuovere la differenziazione di tali cellule in cardiomiociti per attivare la rigenerazione del tessuto cardiaco lesionato.

Come ampiamente illustrato nei capitoli precedenti, l'obiettivo di questo lavoro si è rivolto inizialmente alla ottimizzazione del processo di preparazione delle microsfere in gelatina lisce in modo tale da fungere come sistema ottimale di rilascio controllato del fattore di crescita IGF-1, e microsfere in gelatina porose con caratteristiche idonee all'adesione delle cellule staminali mesenchimali sulla loro superficie e nelle loro cavità interne.

In questo studio si è proceduto alla progettazione dei substrati ed all'ottimizzazione dei molteplici parametri che ne influenzano la preparazione nonché alla loro caratterizzazione. Il primo stadio di questo lavoro è stato rivolto allo studio e all'ottimizzazione del processo di preparazione di microsfere in gelatina lisce e porose attraverso l'utilizzo di due metodologie, singola emulsione (W/O) e doppia emulsione (O/W/O), rispettivamente.

Dalla caratterizzazione morfologica sulle microsfere ottenute mediante singola emulsione si è evidenziata una geometria sferica delle particelle ed una superficie liscia e non porosa. Le dimensioni delle microsfere sono state modulate variando la velocità e la tipologia di agitazione durante l'emulsione. Per ciascuna tipologia di campioni è stato osservato che la morfologia non è cambiata al variare della velocità e del tipo di agitazione e che le microsfere ottenute mediante agitazione magnetica presentano una distribuzione dimensionale piuttosto ampia.

Dai primi esperimenti condotti, si è osservato che le condizioni di crosslikaggio ottimali, tali da rendere le microsfere autoclavabili a 121°C per circa 20 min, sono il 20% in peso di gliceraldeide o glutaraldeide rispetto alla gelatina per 24h.

Le microsfere così ottenute sono state caricate con il fattore di crescita IGF-1 mediante complessazione polianionica tra le molecole e ne è stato studiato il rilascio *in vitro* per un intervallo di tempo di circa 30 giorni. Il profilo di rilascio evidenziato da tale studio ha mostrato una fase iniziale di effetto *burst* nelle prime 24h in cui è stato rilasciato circa il 65 % di IGF-1 e la restante quantità incapsulata è stata rilasciata in maniera graduale durante un intervallo di 28 giorni in seguito alla degradazione delle microsfere in gelatina.

Le microsfere ottenute mediante doppia emulsione si presentano ancora di geometria sferica ma con superficie porosa e dimensione dei pori di circa 20 micron.

Dopo una prima fase tesa a realizzare le microsfere in gelatina e a caratterizzarle dal punto di vista delle proprietà morfologiche, il seguente lavoro di tesi si è soffermato sulla caratterizzazione biologica del materiale. Sono state effettuate delle analisi quantitative su diversi campioni prelevati dalle spinner flask a diversi intervalli di tempo per studiare l'efficienza del sistema di coltura adottato. Si è osservato che dopo 5 h di coltura in agitazione nelle spinner flask più del 90 % delle cellule staminali inoculate hanno aderito alle biglie e che dopo 7 giorni è stato possibile osservare la presenza di più di 60 cellule per ogni biglia. Questi risultati hanno confermato l'efficienza del sistema di coltura in agitazione in spinner flask che ha permesso una migliore distribuzione cellula/biglia rispetto ai sistemi di coltura tradizionali.

Dall'analisi morfologica dei campioni in seguito a coltura cellulare con le cellule mesenchimali staminali in spinner flask, si è osservato che le microsfere sono state ricoperte di monostrati cellulari e che, per tempi di coltura più lunghi, le microsfere hanno aderito tra loro in modo da formare una matrice tridimensionale. Inoltre, risulta particolarmente evidente la presenza di matrice extracellulare prodotta dalle cellule, tanto da non essere stati neanche più in grado di identificare la superficie porosa delle microsfere.

Infine, sono stati effettuati i primi test *in vivo* su ratti a cui è stato provocato un infarto acuto del miocardio mediante legatura dell'arteria coronarica discendente

sinistra. Dai risultati ottenuti si è osservato che l'iniezione intramiocardica di microsfere in gelatina caricate con IGF-1 ha migliorato significativamente la funzione cardiaca, proteggendo i cardiomiociti dalla morte apoptotica per un periodo di tempo prolungato ed ha determinato la proliferazione dei cardiomiociti nell'area perinfartuale con conseguente diminuzione della dimensione dell'infarto ed aumento della densità capillare nel miocardio.

In seguito a questi promettenti risultati iniziali ottenuti dai test *in vivo*, sarà molto interessante studiare il rilascio combinato di IGF-1 e delle cellule staminali mediato dalle microsfere di gelatina in modo da promuovere la differenziazione delle cellule staminali in cardiomiociti per rigenerare il miocardio infartuato.

Bibliografia

- [1] Vacanti, J. P., Langer, R. (1999). Tissue engineering: The design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* 354(Suppl. 1), S132– S134.
- [2] Jessup, M., Brozena, S. (2003). Heart failure. *N Engl J Med* 348, 2007– 2018.
- [3] Copeland, J. G., Smith, R. G., Arabia, F. A., Nolan, P. E., Sethi, G. K., Tsau, P. H., et al. (2004). Cardiac replacement with a total artificial heart as a bridge to transplantation. *N Engl J Med* 351, 859– 867.
- [4] Etzion, S., Kedes, L. H., Kloner, R. A., Leor, J. (2001). Myocardial regeneration: Present and future trends. *Am J Cardiovasc Drugs* 1, 233– 244.
- [5] McPherson, J.M., Sawamura, S., Armstrong, R., 1986 – An examination of the biologic response to injectable, glutaraldehyde cross-linked collagen implants - *J. Biomed. Mater. Res.* 20, 93–107.
- [6] Maeda, M., Tani, S., Sano, A., Fujioka, K., 1999 - Microstructure and release characteristics of the minipellet, a collagen based drug delivery system for controlled release of protein drugs - *J. Controlled. Rel.* 62, 313–324.
- [7] Barbani, N., Giusti, P., Lazzeri, L., Polacco, G., Pizzirani, G., 1995 - Bioartificial materials based on collagen: 1. Collagen cross-linking with gaseous glutaraldehyde - *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 7, 461–469.
- [8] Zipes D, Braunwald E. 2004 *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine* SAUNDERS W B CO, Philadelphia, USA; Katz AM: *Heart Failure*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000

- [9] K.L. Christman, R.J. Lee - Biomaterials for the Treatment of Myocardial Infarction- J.Am College of Cardiology, Vol. 48, No. 5, 2006:907-913
- [10] Vacanti JP. Beyond transplantation. Third annual Samuel Jason Mixter lecture. Arch Surg 1988;123(5):545–9
- [11] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science 1993;260(5110): 920–6
- [12] Vacanti CA, Vacanti JP. The science of tissue engineering. Orthop Clin North Am 2000;31(3):351–6.
- [13] Mann DL. Mechanisms and models in heart failure: a combinatorial approach. Circulation 1999;100:999 –1008.
- [14] Kelley ST, Malekan R, Gorman JH 3rd, et al. Restraining infarct expansion preserves left ventricular geometry and function after acute anteroapical infarction. Circulation 1999;99:135– 42.
- [15] Bowen FW, Jones SC, Narula N, et al. Restraining acute infarct expansion decreases collagenase activity in borderzone myocardium. Ann Thorac Surg 2001;72:1950–6.
- [16] Moainie SL, Guy TS, Gorman JH 3rd, et al. Infarct restraint attenuates remodeling and reduces chronic ischemic mitral regurgitation after postero-lateral infarction. Ann Thorac Surg 2002;74:444 –9.
- [17] Enomoto Y, Gorman JH 3rd, Moainie SL, et al. Early ventricular restraint after myocardial infarction: extent of the wrap determines the outcome of remodeling. Ann Thorac Surg 005;79:881–7.
- [18] Chaudhry PA, Mishima T, Sharov VG, et al. Passive epicardial containment prevents ventricular remodeling in heart failure. Ann Thorac Surg 2000;70:1275– 80.

- [19] Saavedra WF, Tunin RS, Paolocci N, et al. Reverse remodeling and enhanced adrenergic reserve from passive external support in experimental dilated heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:2069–76.
- [20] Pilla JJ, Blom AS, Brockman DJ, Ferrari VA, Yuan Q, Acker MA. Passive ventricular constraint to improve left ventricular function and mechanics in an ovine model of heart failure secondary to acute myocardial infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126:1467–76.
- [21] Sabbah HN, Sharov VG, Gupta RC, et al. Reversal of chronic molecular and cellular abnormalities due to heart failure by passive mechanical ventricular containment. *Circ Res* 2003;93:1095–101.
- [22] Konertz WF, Shapland JE, Hotz H, et al. Passive containment and reverse remodeling by a novel textile cardiac support device. *Circulation* 2001;104 Suppl 1:I270–5.
- [23] Franco-Cereceda A, Lockowandt U, Olsson A, et al. Early results with cardiac support device implant in patients with ischemic and nonischemic cardiomyopathy. *Scand Cardiovasc J* 2004;38:159–63.
- [24] Olsson A, Bredin F, Franco-Cereceda A. Echocardiographic findings using tissue velocity imaging following passive containment surgery with the Acorn CorCap cardiac support device. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005;28:448–53.
- [25] Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Culture of organized cell communities. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;33:15–30.
- [26] Bursac N, Papadaki M, Cohen RJ, et al. Cardiac muscle tissue engineering: toward an in vitro model for electrophysiological studies. *Am J Physiol* 1999;277:H433–44

- [27] Carrier RL, Papadaki M, Rupnick M, et al. Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization. *Biotechnol Bioeng* 1999;64:580–9
- [28] Papadaki M, Bursac N, Langer R, Merok J, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Tissue engineering of functional cardiac muscle: molecular, structural, and electrophysiological studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H168–78.
- [29] Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Choi A, Yau TM. Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation* 1999;100 Suppl:II63–9
- [30] Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, et al. Bioengineered cardiac grafts: a new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation* 2000;102 Suppl 3:III56–61
- [31] Kellar RS, Shepherd BR, Larson DF, Naughton GK, Williams SK. Cardiac patch constructed from human fibroblasts attenuates reduction in cardiac function after acute infarct. *Tissue Eng* 2005;11:1678–87
- [32] Zimmermann WH, Didie M, Wasmeier GH, et al. Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. *Circulation* 2002;106 Suppl 1: I151–7
- [33] Krupnick AS, Kreisel D, Engels FH, et al. A novel small animal model of left ventricular tissue engineering. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21:233– 43.
- [34] Kofidis T, de Bruin JL, Hoyt G, et al. Myocardial restoration with embryonic stem cell bioartificial tissue transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2005;24:737– 44.
- [35] Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* 2006;12:459–65

- [36] Reinecke H, Murry CE. Transmural replacement of myocardium after skeletal myoblast grafting into the heart. Too much of a good thing? *Cardiovasc Pathol* 2000;9:337–44
- [37] Zhang M, Methot D, Poppa V, Fujio Y, Walsh K, Murry CE. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and antideath strategies. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:907–21
- [38] Muller-Ehmsen J, Whittaker P, Kloner RA, et al. Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:107–16.
- [39] Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1078–83.
- [40] Christman KL, Vardanian AJ, Fang Q, Sievers RE, Fok HH, Lee RJ. Injectable fibrin scaffold improves cell transplant survival, reduces infarct expansion, and induces neovasculature formation in ischemic myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:654–60.
- [41] Christman K, Fok HH, Sievers RE, Fang Q, Lee RJ. Fibrin glue alone and skeletal myoblasts in a fibrin scaffold preserve cardiac function after myocardial infarction. *Tissue Eng* 2004;10:403–9.
- [42] Ryu JH, Kim IK, Cho SW, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells using injectable fibrin matrix enhances neovascularisation in infarcted myocardium. *Biomaterials* 2005;26:319–26.
- [43] Huang NF, Yu J, Sievers R, Li S, Lee RJ. Injectable biopolymers enhance angiogenesis after myocardial infarction. *Tissue Eng* 2005; 11:1860–6

- [44] Chekanov V, Akhtar M, Tchekanov G, et al. Transplantation of autologous endothelial cells induces angiogenesis. *Pacing Clin Electrophysiol* 2003;26:496 –9.
- [45] Christman KL, Fok HH, Sievers RE, et al. Myoblasts delivered in an injectable fibrin scaffold improve cardiac function and preserve left ventricular geometry in a chronic myocardial infarction model (abstr). *Circulation* 2003;108:S246 –7.
- [46] Thompson CA, Nasser BA, Makower J, et al. Percutaneous transvenous cellular cardiomyoplasty. A novel nonsurgical approach for myocardial cell transplantation. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1964 –71.
- [47] Dai W, Wold LE, Dow JS, Kloner RA. Thickening of the infarcted wall by collagen injection improves left ventricular function in rats: a novel approach to preserve cardiac function after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:714 –9.
- [48] Leor J, Amsalem Y, Cohen S. Cells, scaffolds, and molecules for myocardial tissue engineering. *Pharmacol Ther* 2005;105:151– 63
- [49] Kofidis T, de Bruin JL, Hoyt G, et al. Injectable bioartificial myocardial tissue for large-scale intramural cell transfer and functional recovery of injured heart muscle. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;128:571–8.
- [50] Zhang P, Zhang H, Wang H, Wei Y, Hu S. Artificial matrix helps neonatal cardiomyocytes restore injured myocardium in rats. *Artif Organs* 2006;30:86 –93.
- [51] Davis ME, Motion JP, Narmoneva DA, et al. Injectable selfassembling peptide nanofibers create intramyocardial microenvironments or endothelial cells. *Circulation* 2005;111:442–50.

- [52] Ronneberger B, Kao WJ, Anderson JM, Kissel T. In vivo biocompatibility study of ABA triblock copolymers consisting of poly(L-lactic-co-glycolic acid) A blocks attached to central poly(oxyethylene) B blocks. *J Biomed Mater Res* 1996;30(1): 31–40.
- [53] Ronneberger B, Kao WJ, Anderson JM, Kissel T. In vivo biocompatibility study of ABA triblock copolymers consisting of poly(L-lactic-co-glycolic acid) A blocks attached to central poly(oxyethylene) B blocks. *J Biomed Mater Res* 1996;30(1): 31–40.
- [54] Sung HJ, Meredith C, Johnson C, Galis ZS. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials* 2004;25(26):5735–42.
- [55] Anderson JM, Gristina AG, Hanson SR, et al. Host reactions to biomaterials and their evaluation. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, editors. *Biomaterials Science: an Introduction to Materials in Medicine*. San Diego, CA: Academic Press, 1996:165–205.
- [56] Shin H, Jo S, Mikos AG. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials* 2003;24:4353– 64.
- [57] Yamada N, Okano T, Sakai H, Karikusa F, Sawasaki Y, Sakurai Y. Thermo-responsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells. *Makromol Chem Rapid Commun* 1990;11:571–6.
- [58] Okano T, Yamada N, Sakai H, Sakurai Y. A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide) *J Biomed Mater Res* 1993;27(10):1243–51
- [59] Tsuda Y, Kikuchi A, Yamato M, Nakao A, Sakurai Y, Umezu M, et al. The use of patterned dual thermoresponsive surfaces for the collective recovery as co-cultured cell sheets. *Biomaterials* 2005;26(14):1885–93.

- [60] A. Kushida, M. Yamato, C. Konno, A. Kikuchi, Y. Sakurai, T. Okano, Decrease in culture temperature releases monolayer endothelial cell sheets together with deposited fibronectin matrix from temperature-responsive culture surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.* 45 (4) (1999) 355–362
- [61] A.G. Mikos, L.V. McIntire, J.M. Anderson, J.E. Babensee, Host response to tissue engineered devices, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 33 (1–2) (1998) 111–139.
- [62] M. Yamato, M. Utsumi, A. Kushida, C. Konno, A. Kikuchi, T. Okano, Thermoresponsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered keratinocyte sheets without disperse by reducing temperature, *Tissue Eng.* 7 (4) (2001) 473–480.
- [63] K. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida, K. Watanabe, N. Maeda, H. Watanabe, K. Yamamoto, S. Nagai, A. Kikuchi, Y. Tano, T. Okano, Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperatureresponsive cell culture surface, *Transplantation* 77 (3) (2004) 379–385.
- [64] Y. Shiroyanagi, M. Yamato, Y. Yamazaki, H. Toma, T. Okano, Transplantable urothelial cell sheets harvested noninvasively from temperature-responsive culture surfaces by reducing temperature, *Tissue Eng.* 9 (5) (2003) 1005–1012.
- [65] Y. Shiroyanagi, M. Yamato, Y. Yamazaki, H. Toma, T. Okano, Urothelium regeneration using viable cultured urothelial cell sheets grafted on demucosalized gastric flaps, *BJU Int.* 93 (7) (2004) 1069–1075.
- [66] M. Hasegawa, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano, I. Ishikawa, Human periodontal ligament cell sheets can regenerate periodontal ligament tissue in an athymic rat model, *Tissue Eng.* 11 (3–4) (2005) 469–478.
- [67] T. Shimizu, M. Yamato, Y. Isoi, T. Akutsu, T. Setomaru, K. Abe, A. Kikuchi, M. Umezu, T. Okano, Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-

dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces, *Circ. Res.* 90 (3) (2002) e40.

[68] J. Yang, M. Yamato, C. Kohno, A. Nishimoto, H. Sekine, F. Fukai, T. Okano, Cell sheet engineering: recreating tissues without biodegradable scaffolds, *Biomaterials* 26 (33) (2005) 6415–6422.

[69] M. Harimoto, M. Yamato, M. Hirose, C. Takahashi, Y. Isoi, A. Kikuchi, T. Okano, Novel approach for achieving double-layered cell sheets coculture: overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes, *J. Biomed. Mater. Res.* 62 (3) (2002) 464–470.

[70] H. Sekine, T. Shimizu, S. Kosaka, E. Kobayashi, T. Okano, Cardiomyocyte bridging between hearts and bioengineered myocardial tissues with mesenchymal transition of mesothelial cells, *J. Heart Lung Transplant.* 25 (3) (2006) 324–332.

[71] Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, Didie M, Munzel F, Heubach JF, et al. Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res* 2002;90(2): 223–30.

[72] Papadaki M, Bursac N, Langer R, Merok J, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Tissue engineering of functional cardiac muscle: molecular, structural, and electrophysiological studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280(1):H168–78.

[73] Li RK, Yau TM, Weisel RD, Mickle DA, Sakai T, Choi A, et al. Construction of a bioengineered cardiac graft. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;119(2):368–75.

[74] T. Shimizu, H. Sekine, J. Yang, Y. Isoi, M. Yamato, A. Kikuchi, E. Kobayashi, T. Okano, Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues, *FASEB J.* 20 (6) (2006) 708–710.

- [75] vanWezel, A. (1967) Growth of cell strains and primary cells on microcarriers in homogeneous culture. *Nature* 216, 64–65
- [76] Tree, J.A. et al. (2001) Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains. *Vaccine* 19, 3444– 3450
- [77] J Malda, C Frondoza Microcarriers in the Engineering of cartilage and bone, *Trends in biotechnology* Vol. 24No.7 July 2006
- [78] A Werner, S Duvar, J Muthing, H Buntmeyer, H Lunsdorf, M Strauss, J Lehmann Cultivation of immortalized Human Hepatocytes HepZ on Macroporous CultiSpher G Microcarriers
- [79] Liu, J.Y. et al. (2004) Autologous cultured keratinocytes on porcine gelatin microbeads effectively heal chronic venous leg ulcers. *Wound Repair Regen.* 12, 148–156
- [80] Kang, S.W. et al. (2005) Poly(lactic-co-glycolic acid)microspheres as an injectable scaffold for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng.* 11, 438–447
- [81] Freed, L. et al. (1993) Cultivation of cell–polymer cartilage implants in bioreactors. *J. Cell. Biochem.* 51, 257–264 41
- [82] Baker, T. and Goodwin, T. (1997) Three-dimensional culture of bovine chondrocytes in rotating-wall vessels. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 33, 358–365 - 41 - 42.
- [83] Frondoza, C. et al. (1996) Human chondrocytes proliferate and produce matrix components in microcarrier suspension culture. *Biomaterials* 17, 879–888 43.

- [84] Shikani, A.H. et al. (2004) Propagation of human nasal chondrocytes in microcarrier spinner culture. *Am. J. Rhinol.* 18, 105–112
- [85] GA Silva, OP Coutinho, P Ducheyne, IM Shapiro, RL Reis, the effect of starch and starch-bioactive glass composite microparticles on the adhesion and expression of the osteoblastic phenotype of a bone cell line. *Biomaterials* 2006 in press.
- [86] Hay, E.D. ed., *Cell Biology of Extracellular Matrix*, 2nd Ed. New York: Plenum Press, 1991.
- [87] Yasuhiko Tabata, *Tissue Regeneration Based on Growth Factor Release*, *Tissue Engineering* Vol.9, Suppl. 1, 2003, S5-15
- [88] Park, K., Shakaby, H., and Park, H. *Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery*. Lancaster, PA: Technomic Publishing, 1993.
- [89] Tabata, Y., and Ikada, Y. Protein release from gelatin matrices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 31, 287, 1998.
- [90] Tabata, Y., Nagano, A., and Ikada, Y. Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor. *Tissue Eng.* 5, 127, 1999.
- [91] A. Hosaka, H. Koyama, T. Kushibiki, Y. Tabata, N. Nishiyama, T. Miyata, H. Shigematsu, T. Takato, H. Nagawa, Gelatin hydrogel microspheres enable pinpoint delivery of basic fibroblast growth factor for the development of functional collateral vessels, *Circulation* 110 (2004) 3322–3328.
- [92] K. Ueyama, G. Bing, Y. Tabata, M. Ozeki, K. Doi, K. Nishimura, H. Suma, M. Komeda, Development of biologic coronary artery bypass grafting in a rabbit model: revival of a classic concept with modern biotechnology, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 127 (2004) 1608–1615.

- [93] H. Nakajima, Y. Sakakibara, K. Tambara, A. Iwakura, K. Doi, A. Marui, K. Ueyama, T. Ikeda, Y. Tabata, M. Komeda, Therapeutic angiogenesis by the controlled release of basic fibroblast growth factor for ischemic limb and heart injury: toward safety and minimal invasiveness, *J. Artif. Organs* 7 (2004) 58– 61.
- [94] Y. Sakakibara, K. Tambara, G. Sakaguchi, F. Lu, M. Yamamoto, K. Nishimura, Y. Tabata, M. Komeda, Toward surgical angiogenesis using slow-released basic fibroblast growth factor, *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg.* 24 (2003) 105–111 (discussion 112).
- [95] Sacca` L, Cittadini A, Fazio, S. Growth hormone and the heart. *Endocr Rev* 1994; 15:555–573
- [96] Yang R, Bunting S, Gillet N, Clark R, Jin H. Growth hormone improves cardiac performance in experimental heart failure. *Circulation* 1995; 92:262–267
- [97] Tabata Y, Hijikata S, Muniruzzaman M, Ykada Y. Neovascularization effect of biodegradable gelatin microspheres incorporating basic fibroblast growth factor. *J Biomater Sci Polym* 1999;10:79-94
- [98] Iwakura A, Fujita M, Kataoka K, et al. Intramyocardial sustained delivery of basic fibroblast growth factor improves angiogenesis and ventricular function in a rat infarct model. *Heart Vessels* 2003;18:93–9.
- [99] Christman KL, Fang Q, Yee MS, Johnson KR, Sievers RE, Lee RJ. Enhanced neovasculature formation in ischemic myocardium following delivery of pleiotrophin plasmid in a biopolymer. *Biomaterials* 2005;26:1139–44.
- [100] Hsieh PC, Davis ME, Gannon J, MacGillivray C, Lee RT. Controlled delivery of PDGF-BB for myocardial protection using injectable selfassembling peptide nanofibers. *J Clin Invest* 2006;116:237–48.
- [101] Froesch ER, Schmid C, Schwander J, *et al.* Actions of insulin-like growth factors.

Annu Rev Physiol 1985;**47**:443–67.

[102] LeRoith D, Roberts CT Jr. Insulin-like growth factors. *Ann N Y Acad Sci* 1993;**692**:1–9.

[103] Parrizas M, Saltiel AR, LeRoith D. Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 1997;**272**:154–61

[104] Duerr RL, Huang S, Miraliakbar HR, *et al.* Insulin-like growth factor-1 enhances ventricular hypertrophy and function during the onset of experimental cardiac failure. *J Clin Invest* 1995;**95**:619–27.

[105] Buerke M, Murohara T, Skurk C, *et al.* Cardioprotective effect of insulin-like growth factor 1 in myocardial ischemia followed by reperfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;**92**:8031–5.

[106] Mehrhof FB, Muller FU, Bergmann MW, *et al.* In cardiomyocyte hypoxia, insulin-like growth factor-I-induced antiapoptotic signaling requires phosphatidylinositol-3-OH-kinase-dependent and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the transcription factor cAMP response element-binding protein. *Circulation* 2001;**104**:2088–94.

[107] Vandelli, M.A., Pifferi, G., Seghizzi, R., Cameroni, R., 1995. Swelling behaviour of gelatin microspheres crosslinked with D,L-glyceraldehyde. The effect of the preparative factors. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 5, 116–119.

[108] Nisikimi T, Uchino K, Flohlich ED. Effects of α 1-adrenergic blockade on intrarenal hemodynamics in heart failure rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1998; 262:198-203

[109] Bancel S, HuWS. Confocal scanning microscopy examination of cell distribution in macroporous microcarriers. *Biotechnol Prog* 1996;12:398–402.

[110] Bacallo, R., Bomsel, M., Stelzer, E. H. K., and De Mey, J. (1990)-Guiding principles of specimen preservation for confocal fluorescence microscopy-In "Handbook of Biological Confocal Microscopy" (J. Pawley, ed.), pp. 197-205. Plenum, New York

[111] Bacallo, R., and Garfinkel, A.-Three- Dimensional Confocal Microscopy: Volume Investigation of Biological Systems.-(Stevens, J. K. et al., eds.), pp. 172-4. Academic Press, London. (1994).

[112] Tsien, R.Y., and Waggoner, A.-Fluorophores for confocal microscopy: photophysics and photochemistry.-In "Handbook of Biological Confocal Microscopy" (J. B. Pawley, ed.) pp. 153-161. Plenum, New York (1990).

[113] Achet D, He XW. Determination of the renaturation level in gelatin films. *Polymer* 1995;36:787}91

[114] Tanioka A, Miyasaka K, Ishikawa K. Reconstitution of collagen fold structure with stretching gelatin "lm. *Biopolymers* 1976;15:1505}11

[115] Finch A, Ledward DA. Shrinkage of collagen "bers. *Biochim Biophys Acta* 1972;278:433}9.

[116] Bigi A, Cojazzi G, Roveri N, Koch MHJ. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction study of tendon collagen thermal denaturation. *Int J Biol Macromol* 1987;9:363}7.

[117] Bailey A, Paul RG. The mechanisms and consequences of the maturation and aging of collagen. *Proc Indian Acad Sci (Chem Sci)* 1999;111:57}69.

- [118] Fraga AN, Williams RJJ. Thermal properties of gelatin Polymer 1985;26:113}8.
- [119] Kopp J, Bonnet M, Renou JP. Effect of collagen crosslinking on collagen-water interaction (A DSC investigation). Matrix1989;9:443}50
- [120] A. Veis, Macromolecular chemistry of gelatin, Academic Press, New York, 1964
- [121] A. George, G. Radhakrishnan, K.T. Joseph – J. Macromolecular Science Chem 21 (1984) 179
- [122] T.A. Holland, Y. Tabata, A.G. Mikos, In vitro release of transforming growth factor-beta1 from gelatin microparticles encapsulated in biodegradable, injectable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels, J. Control. Release 91 (2003) 299–313.